

# **Identifizierung und Charakterisierung kryptischer Aberrationen bei akuten myeloischen Leukämien**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller Universität Jena**

**von Diplom-Biologin Madeleine Groß  
geboren am 09.05.1980 in Plauen**

Gutachter: 1. PD Dr. rer. nat. / med. habil. Thomas Liehr  
2. Prof. Dr. med. habil. Uwe Claussen  
3. PD Mag. Dr. Irmgard Verdorfer

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.12.2008

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>II</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Entwicklung der Zytogenetik</b>	<b>8</b>
<b>1.2</b>	<b>Molekulare Zytogenetik</b>	<b>9</b>
1.2.1	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	10
1.2.2	Gebräuchliche DNA-Sonden	11
1.2.3	Weiterentwicklungen der FISH	12
1.2.4	FISH-Bänderungsmethoden	12
1.2.5	Weitere Methoden	14
1.2.5.1	CGH	14
1.2.5.2	Mikrosezierung	14
<b>1.3</b>	<b>Akute myeloische Leukämie</b>	<b>15</b>
1.3.1	AML mit zytogenetisch normalem Karyotyp	16
1.3.2	AML mit Trisomie 8	16
<b>1.4</b>	<b>Strukturelle Varianten im menschlichen Genom</b>	<b>17</b>
1.4.1	Mikroskopisch sichtbare Varianten	17
1.4.2	Submikroskopisch sichtbare Varianten	17
<b>1.5</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Untersuchungsmaterialien und Chromosomenpräparation</b>	<b>21</b>
2.1.1	Verwendete Reagenzien für die Chromosomenpräparation	22
2.1.2	Chromosomenpräparation aus Vollblut	22
2.1.3	Chromosomenpräparation aus Knochenmark	23
2.1.4	Präparation der Objektträger für FISH	24
2.1.5	Probenvorbereitung für FISH an Spermien	24
<b>2.2</b>	<b>DNA-Sonden für FISH</b>	<b>24</b>
2.2.1	Mikrosezierungssonden	24
2.2.2	BAC-Sonden	25
2.2.3	Weitere lokusspezifische Sonden	25
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>26</b>

I Inhaltsverzeichnis	III
2.3.1 Isolierung der Plasmid-DNA	26
2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.3.2.1 DOP-PCR	27
2.3.2.2 Reamplifizierungs-PCR	29
2.3.2.3 Markierungs-PCR	30
2.3.2.4 Alternative DNA-Markierung mit Nick-Translation	31
2.3.2.5 Mikrosatelliten-PCR	32
2.3.2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.3.2.7 Gradienten-PCR	34
2.3.2.8 Agarosegelelektrophorese	34
2.3.2.9 RealTime-PCR	35
2.3.3 DNA-Fällung	36
2.3.4 SNP-Arrays	37
<b>2.4 Mikrosezierung</b>	<b>37</b>
2.4.1 Mikrosezierung von Chromosomen	37
2.4.1.1 Vorbereitung der Mikrosezierung	37
2.4.1.2 Die Durchführung der Mikrosezierung	39
2.4.2 Mikrosezierung von Zellkernen	40
2.4.2.1 Vorbereitung der Mikrosezierung	40
2.4.2.2 Durchführung der Mikrosezierung	40
2.4.3 FISH-Mikrosezierung	40
<b>2.5 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung</b>	<b>41</b>
2.5.1 Verwendete Reagenzien	41
2.5.2 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate	42
2.5.3 Denaturierung der Ziel-DNA	43
2.5.4 Prähybridisierung	43
2.5.5 Hybridisierung	44
2.5.6 Waschen und Detektion	45
2.5.7 Auswertung	46
2.5.8 Auswertung der BAC-Signale	46
2.5.9 FISH auf Spermisuspension	46



<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Identifizierung kryptischer Aberrationen bei akuten myeloischen Leukämien mit zytogenetisch unauffälligem Karyotyp</b>	<b>48</b>
3.1.1	Vorarbeiten mittels micro-CGH	48
3.1.2	Untersuchungen mittels mMCB	48
3.1.2.1	Detektierte Aberrationen mit mMCB und deren Bestätigung durch den Einsatz lokusspezifischer Sonden	49
3.1.3	Untersuchungen Subtelomerbereiche	52
<b>3.2</b>	<b>Identifizierung kryptischer Aberrationen bei akuten myeloischen Leukämien mit Trisomie 8 als einzige Aberration</b>	<b>54</b>
3.2.1	Untersuchungen mittels mMCB	54
3.2.2	Untersuchungen Subtelomerbereiche	55
<b>3.3</b>	<b>Etablierung einer neuen FISH Methode zur Unterscheidung homologer Chromosomen: pod-FISH</b>	<b>56</b>
3.3.1	Vorarbeiten zur Validierung von pod-FISH	56
3.3.1.1	Auswahl und Test der DNA-Sonden	56
3.3.1.2	Optimierung der Signalstärke	56
3.3.1.3	Auswertung der Signale mit der Software Scion	57
3.3.1.4	Definition Signalunterschied	57
3.3.1.5	Zusammenstellung chromosomenspezifischer SONDENSSETS	59
3.3.2	Validierung der pod-FISH Methode	60
3.3.2.1	Klinisch unauffällige Fälle	60
3.3.2.2	Fälle mit Polymorphismen im Heterochromatin	61
3.3.2.3	UPD-Fälle	63
3.3.2.4	Fall mit Verdacht auf Zwillingschwangerschaft	64
3.3.2.5	Fälle mit Chromosomenaberrationen	65
3.3.2.6	Etablierung eines gesamtgenomischen pod-FISH SONDENSSETS	67
3.3.2.7	Anwendung des gesamtgenomischen pod-FISH SONDENSSETS	67
3.3.2.8	Etablierung eines gesamtgenomischen pod-FISH SONDENSSETS für Knochenmarksuspensionen	70
3.3.3	Bestätigung von pod-FISH durch molekularbiologische Methoden	70

I Inhaltsverzeichnis	V
3.3.3.1 Anwendung der RealTime-PCR	70
3.3.3.2 Anwendung der SNP-Arrays	72
3.3.4 T-Zell Rezeptorgene	72
3.3.4.1 Anwendung von pod-FISH	79
<b>3.4 Anwendung von pod-FISH bei AML</b>	<b>81</b>
3.4.1 Nachweis segmentaler UPDs bei NK-AML und AML mit Trisomie 8	81
3.4.2 Nachweis der Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 bei AML-Fällen mit Trisomie 8	82
3.4.3 Bestimmung der Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 bei AML mit Trisomie 8 mittels Mikrosatellitenanalyse	90
<b>4 Diskussion</b>	<b>92</b>
<b>4.1 Molekularzytogenetische Untersuchungen der AML-Fälle</b>	<b>92</b>
4.1.1 Detektierte Aberrationen mittels einer gesamtgenomischen Untersuchung bei NK-AML	92
4.1.2 Trisomie 8 AML-Fälle	94
4.1.3 Anwendung mMCB bei AML-Fällen	95
4.1.4 Detektierte Aberrationen der Subtelomerbereiche bei NK-AML	97
4.1.5 Untersuchungen der Subtelomerbereiche bei AML-Fällen mit Trisomie 8	100
4.1.6 Bedeutung detektierter Aberrationen in den Subtelomerbereichen	100
4.1.7 Detektierte Aberrationen als prognoserelevante Marker?	102
4.1.8 Zusammenfassung	102
<b>4.2 pod-FISH: eine neue FISH-Methode zur Unterscheidung homologer Chromosomen</b>	<b>103</b>
4.2.1 Etablierung der Methode	103
4.2.2 Somatische Rekombinationen in CNV-Regionen	104
4.2.3 Zusammenfassung pod-FISH	106
<b>4.3 T-Zell Rezeptorregion</b>	<b>106</b>
<b>4.4 Anwendung von pod-FISH bei AML-Fällen</b>	<b>108</b>
4.4.1 Nachweis segmentaler UPDs bei NK-AML	108

---

4.4.2	Nachweis der Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 bei AML-Fällen mit Trisomie 8 und Detektion kryptischer Aberrationen	109
<b>4.5</b>	<b>Detektierte Aberrationen bei AML-Fällen und deren Bedeutung</b>	<b>111</b>
<b>4.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>113</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>115</b>
<b>II</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>III</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>XXV</b>
<b>IV</b>	<b>Anhang</b>	<b>XXIX</b>
<b>V</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>LXIII</b>
<b>VI</b>	<b>Publikationen</b>	<b>LXIV</b>
<b>VII</b>	<b>Danksagung</b>	<b>LXVIII</b>
<b>VIII</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>LXIX</b>

## 1 Einleitung

Die Krankheit Leukämie (= Blutkrebs) wurde erstmals im Jahre 1845 von dem deutschen Mediziner und Wissenschaftler Rudolf Virchow (1821–1902) beschrieben, der bei seinen Patienten eine stark vermehrte Bildung von weißen Blutkörperchen beobachtete. Der aus dem griechischen stammende Begriff „Leukämie“ beschreibt eine klonale Erkrankung des blutbildenden Systems. Hierbei unterscheidet man nach Krankheitsverlauf zwischen akuter und chronischer Leukämie bzw. nach den Ursprungszellen der Krankheit zwischen myeloischer und lymphatischer Leukämie ([www.kompetenznetz-leukämie.de](http://www.kompetenznetz-leukämie.de), Stand April 2008). Die akute myeloische Leukämie (AML) entsteht durch genetische Veränderungen und eine daraus resultierende Akkumulation myeloischer Vorläuferzellen im Blut und Knochenmark, deren Folgen eine Störung der Proliferation, Reifung und Differenzierung des hämatopoetischen Systems sind. Es findet eine zunehmende Verdrängung der normalen Hämatopoese statt. Die Diagnostik einer AML am Patienten basiert auf einer Kombination verschiedener Methoden. Neben einer morphologischen und zytochemischen Beurteilung von Knochenmarksausstrichen und einer Immunphänotypisierung der Zellen mit Antikörpern, die gegen Zelloberflächenantigene gerichtet sind, ist die Zytogenetik für die Diagnosestellung ein letzter obligater und entscheidender Schritt (Heilmeier *et al.*, 2007). Die Zytogenetik in Form der klassischen Chromosomenbänderung, ergänzt durch die molekularzytogenetische Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), kann zur Diagnosesicherung beitragen und ist neben dem Alter des Patienten ein wichtiger Marker für Prognose und Therapieplanung, sowie für Untersuchungen der Verlaufskontrollen (Fonatsch und Krömer, 2005). Gegenwärtig sind bei der AML mehr als 200 verschiedene Chromosomenaberrationen beschrieben (Mrózek *et al.*, 2001), die bei etwa 55 % der Patienten auftreten und häufig mit einer günstigen oder ungünstigen Prognose assoziiert sind. Die restlichen 45 % der AML-Patienten zeigen einen zytogenetisch unauffälligen Karyotyp (NK-AML) und werden der intermediären Prognosegruppe zugeordnet (z.B. Mrózek *et al.*, 2004; Bacher *et al.*, 2006). Zusätzlich können bei der NK-AML verschiedene molekulargenetische Veränderungen, z.B. Längenmutationen des *FLT3* Gens (Verdoppelung von Nukleotiden der Gensequenz) (Schnittger *et al.*, 2002) und sekundäre zytogenetische Veränderungen (am häufigsten ein Zugewinn des Chromosoms 8) auftreten (Heim und Mitelman, 1995; Paulsson *et al.*, 2001). Diese Gruppe der NK-AML zeugt von einer hohen prognostischen Heterogenität. So sind beispielsweise die Raten für eine komplette Remission und die Dauer des Überlebens im gleichen Bereich wie für das Gesamtkollektiv der AML (Heimeier *et al.*, 2007). Aus diesem Grund ist es wichtig, prognostische Marker zu identifizieren, die möglicherweise zu einer individuelleren Prognose- und Therapieplanung führen und den Ausgang der Krankheit für den Patienten exakter bestimmen lassen.

Die vorliegende Arbeit hat im ersten Teil das Ziel, Knochenmarksproben von NK-AML Patienten genauer zu charakterisieren und möglicherweise prognostisch relevante Marker zu identifizieren. Dazu werden neueste molekularzytogenetische Methoden, die eine umfassende Analyse der Chromosomen ermöglichen, eingesetzt.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung einer neuen Methode, mit der es erstmals möglich ist, homologe Chromosomen auf Einzelzellniveau zu unterscheiden und damit Aussagen über die parentale Herkunft einzelner Chromosomen bzw. epigenetische Veränderungen in Form von kompletten oder partiellen chromosomalen „Uniparentalisierungen“ nachzuweisen. Weiterhin wird diese Methode verwendet, um bei NK-AML Fällen nach tumorassoziierten Markern zu suchen und um bei Trisomie 8 Fällen die Herkunft des zusätzlichen Chromosoms zu bestimmen.

## 1.1 Entwicklung der Zytogenetik

Die Zytogenetik ist ein Teilgebiet der Genetik, das sich mit Chromosomen und deren strukturellen Veränderungen beschäftigt. Die historischen Anfänge der humanen Zytogenetik werden auf das Ende des 19. Jahrhunderts zurückdatiert. Im Jahre 1879 machte der deutsche Pathologe Arnold erstmals menschliche Chromosomen unter dem Lichtmikroskop sichtbar und Waldeyer führte 1888 den Begriff „Chromosom“ (chroma = Farbe, soma = Körper) ein. Bereits 1903 postulierte Sutton zeitgleich mit Boveri die Chromosomen als Träger menschlicher Erbanlagen. Die exakte Bestimmung der menschlichen Chromosomenzahl von 46 gelang 53 Jahre später im Jahre 1956 durch Tijo und Levan, die für ihre Untersuchungen embryonale Lungenzellen verwendeten. Im selben Jahr bestätigten Ford und Hamerton diese Zahl in menschlichen Spermatozyten. Die sich anschließenden Untersuchungen von Chromosomen bei klinisch auffälligen Personen führten zur Entdeckung von menschlichen Chromosomenanomalien. Im Jahre 1959 wurde erstmalig das Down-Syndrom, die Trisomie 21, beschrieben (Lejeune *et al.*, 1959). Weiterhin konnten im selben Jahr der Karyotyp für das Klinefelter-Syndrom (47,XXY; Jacobs und Strong, 1959) und das Turner-Syndrom (45,X; Ford *et al.*, 1959) bestimmt werden. Zur selben Zeit konnte erstmals eine erworbene Chromosomenaberration in Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs gebracht werden. Die amerikanischen Forscher Nowell und Hungerford beschrieben 1960 das Philadelphia-Chromosom bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie.

Bis Ende der 60er Jahre konnten die Chromosomen nur konventionell, d.h. einheitlich durchgängig angefärbt werden, was lediglich eine Einteilung nach der Größe der Chromosomen und der Lage des Zentromers ermöglichte. Ende der 60er Jahre begann die Phase der Bänderungszytogenetik. Caspersson und Mitarbeiter entdeckten, dass der Fluoreszenzfarbstoff Quinacrin in die DNA interkaliert und dadurch ein distinktes Bandenmuster der Chromosomen erzeugt (Q-Bänderung) (Caspersson *et al.*, 1968, 1970a, 1970b). Parallel zu der Q-Bänderungsmethode wurden weitere Chromosomenbänderungstechniken entwickelt. Bei der G-Bänderung (auch GTG-Bänderung: *G-bands by Trypsin using Giemsa*) werden die Chromosomen vor der Behandlung kontrolliert mit Trypsin verdaut und anschließend mit dem DNA- und proteinbindenden Farbstoff Giemsa gefärbt (Seabright, 1971). Die G-Banden sind im Wesentlichen identisch mit den Q-Banden. Eine weitere Bänderungsmethode ist die R-Bänderung. Hierbei werden die Chromosomen vor der Giemsa-Färbung in einer Salzsäurelösung denaturiert (Dutrillaux und Lejeune, 1971). Nach der Färbung mit Giemsa erhält man ein reverses G-Bandenmuster. Diese drei

Bänderungsmethoden erzeugen, über die gesamte Länge der Chromosomen verteilt, spezifische Bandenmuster. Zusätzlich gibt es Methoden, mit denen bestimmte Chromosomenstrukturen angefärbt werden können. So können beispielsweise das konstitutive Heterochromatin im Bereich der Zentromere, die Satelliten der kurzen Arme akrozentrischer Chromosomen sowie heterochromatische Bereiche auf den Chromosomen 1, 9, 16 und Y mit Hilfe der C-Bänderung sichtbar gemacht werden (Arrighi und Hsu, 1971).

Die Entwicklung der oben genannten Bänderungstechniken ermöglichte neben der Beschreibung numerischer Chromosomenaberrationen, wie Polyploidie (Vielfaches des gesamten Chromosomensatzes) und Aneuploidie (Verlust oder Zugewinn von einzelnen Chromosomen), auch die Beschreibung von intra- und interchromosomalen Umlagerungen. Diese treten in Form von Translokationen (Austausch von Bereichen zwischen den Chromosomen), Inversionen (intrachromosomale Veränderung, ein Teil des Chromosoms liegt um 180° gedreht vor), Deletionen (Verlust von chromosomalen Material) und Duplikationen (Verdopplung von chromosomalen Material) auf.

Heutzutage ist die GTG-Bänderung in der Routinediagnostik der Zytogenetik die am häufigsten verwendete Bänderungstechnik der Chromosomen. Sie bildet die Grundlage für die Nomenklatur der Chromosomen, die im „*International System for Human Cytogenetic nomenclature*“ (ISCN 2005) festgelegt ist. Die grundsätzliche Bezeichnung für gebänderte Chromosomen wurde 1971 in Paris verabschiedet. In der Nomenklatur werden die Chromosomen einander nach Größe, Lage des Zentromers und des Bandenmusters zugeordnet und bezeichnet. Dadurch können alle numerischen und strukturellen Aberrationen anhand einer Karyotypformel exakt beschrieben werden.

Die Methode der GTG-Bänderung hat allerdings ihre Grenzen. Es können lediglich Veränderungen im Bandenmuster, in der Größe der einzelnen Banden bzw. des Chromosoms und im Zentromerindex dargestellt werden. Die Frage nach der Herkunft von chromosomalem Material in Form einer oder mehrerer zusätzlicher Banden, die Identität von Markerchromosomen und die genaue Bruchpunktbestimmung von chromosomalen Veränderungen kann mit der GTG-Bänderung nicht eindeutig geklärt werden. Diese Grenzen wurden durch die Entwicklung der molekularen Zytogenetik in den 80er Jahren überwunden.

## 1.2 Molekulare Zytogenetik

Die Schlüsselmethode der molekularen Zytogenetik ist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH).

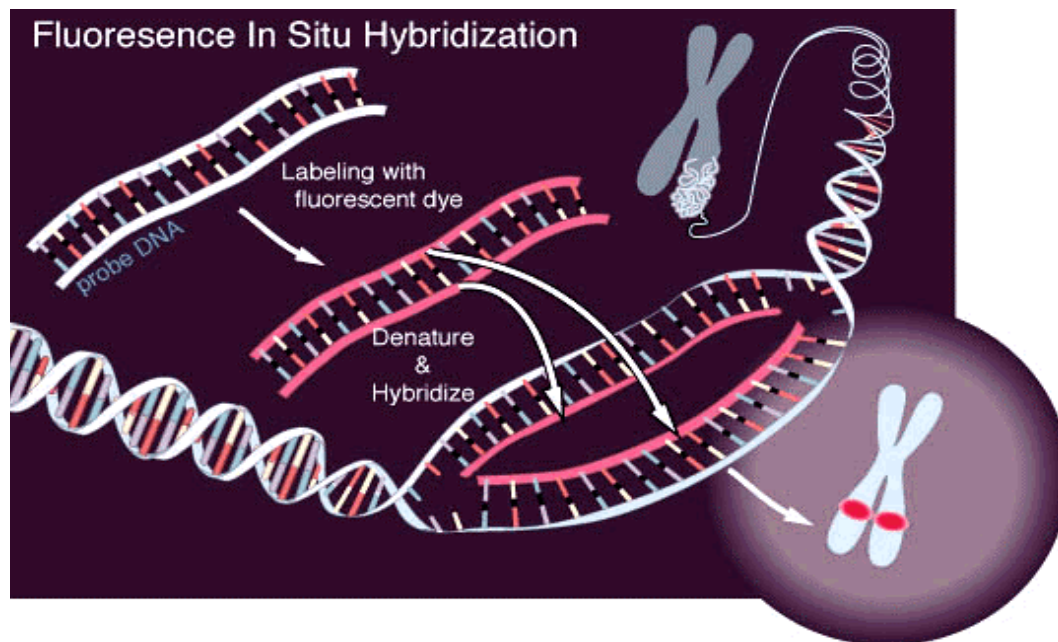
Bei der *in situ* Hybridisierung handelt es sich um eine geeignete Methode zur Lokalisierung von Nukleinsäuresequenzen (DNA- und RNA-Sequenzen) in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen. Die Nukleinsäure lässt sich direkt im biologischen Präparat – *in situ* – nachweisen (Pardue und Gall, 1969; John *et al*, 1969). Die ersten Hybridisierungen erfolgten mit einer radioaktiven Markierung der Nukleinsäuren, z.B. mit Tritium, und deren Detektion über Autoradiographie. So konnten 1981 die ersten Gene durch *in situ* Hybridisierung mit radioaktiver Markierung der Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden (Harper und Saunders,

1981; Malcolm *et al.*, 1981; Gerhard *et al.*, 1981). Der Nachteil der radioaktiven Markierung bestand in einem hohen zeitlichen Aufwand und einem damit verbundenen erhöhten Strahlenrisiko für die Mitarbeiter. Die nicht-radioaktive Markierung der DNA-Sonden mit dem Hapten Biotin, welches durch die Bindung von Avidin gekoppelt mit einem Fluorochrom detektiert wird, wurde 1981 entwickelt (Langer *et al.*). Fünf Jahre später wurde erstmals von Pinkel und Mitarbeitern die Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung an menschlichen Chromosomen beschrieben (Pinkel *et al.*, 1986).

### 1.2.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Methode der FISH basiert auf chemisch markierten DNA-Sonden, die direkt auf Chromosomen in allen Zellzyklusphasen (Metaphase und Interphase) hybridisiert und durch Fluoreszenzsignale sichtbar gemacht werden (siehe Abb. 1). Die DNA-Sonden werden mit Fluoreszenzfarbstoffen (direkte Markierung) oder mit Haptenen (indirekte Markierung), die jeweils an modifizierte Nukleotide gekoppelt sind, markiert. Die Markierung erfolgt entweder über eine Polymerasekettenreaktion (PCR, Saiki *et al.*, 1986) oder eine Nick-Translation (Rigby *et al.*, 1977). Anschließend wird die DNA-Sonde denaturiert, so dass sie als Einzelstrang vorliegt. Die Ziel-DNA, welche sich in Form von Metaphasechromosomen oder Interphasezellkernen auf Objektträgern befindet, wird ebenfalls denaturiert. Anschließend werden die Sonden-DNA und die Ziel-DNA zusammengeführt (Hybridisierung). Aufgrund der komplementären Basenpaarung lagert sich die DNA-Sonde während der Hybridisierung an die entsprechende unmarkierte Ziel-DNA auf dem Objektträger an. Anschließend werden durch mehrere Waschschrte ungebundene DNA-Sonden entfernt. Bei der indirekten Markierung wird die DNA-Sonde durch fluoreszenzmarkierte Antikörper, die spezifisch an die Haptene in der DNA-Sonde binden, sichtbar gemacht. Im Gegensatz dazu können DNA-Sonden, die direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, ohne diesen Detektionsschritt ausgewertet werden. Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop. Das Mikroskop ist mit speziellen Anregungsfiltern ausgestattet, die der Emissionswellenlänge des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffes entsprechen (Rautenstrauss und Liehr; 2002).

Für die FISH stellen repetitive Sequenzen in den DNA-Sonden ein Problem dar, da sie ubiquitär im Genom vorkommen und zu unspezifischen Hybridisierungen der DNA-Sonden führen können. Deshalb wird die Hybridisierung bestimmten Suppressionsbedingungen unterstellt. Bei der Denaturierung der DNA-Sonden wird ein Überschuss an unmarkierter, repetitiver DNA hinzugefügt. Diese bindet auf Grund ihrer besonderen Hybridisierungskinetik schnell an repetitive Sequenzen innerhalb der DNA-Sonden, die dadurch abgesättigt werden. Somit wird ein spezifisches Hybridisierungssignal der DNA-Sonden gewährleistet (Murken *et al.*, 2006).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nach Darryl Leja (<http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/fish.html>, Stand April 2008).**

### 1.2.2 Gebräuchliche DNA-Sonden

Für die FISH gibt es mittlerweile eine umfangreiche Auswahl an DNA-Sonden, die in Abhängigkeit von den Fragestellungen in Diagnostik bzw. Forschung Anwendung finden. Für den Einsatz als Sonden eignen sich z.B. regionspezifische, repetitive Sequenzen wie Zentromer-, Heterochromatin- und Telomersequenzen. Diese Bereiche beinhalten eine große Anzahl an sich wiederholender DNA-Sequenz. Die oben erwähnten Zentromersonden in Form von markierter Alpha-Satelliten-DNA eignen sich für FISH an Interphasekernen und geben Rückschlüsse auf die Kopienzahl des entsprechenden Chromosoms (Rautenstrauss und Liehr; 2002).

Des Weiteren werden chromosomenspezifische Banken, mit denen das ganze Chromosom (*whole chromosome painting*, wcp) oder chromosomenarmspezifische Banken, mit denen jeweils der kurze (p, *petit*) oder der lange (q, *queue*) Arm der Chromosomen markiert werden kann (*partial chromosome painting*, pc), eingesetzt. Die Herstellung der wcp-Sonden erfolgt durch eine glasnadelbasierende Mikrosezierung (Senger *et al.*, 1997) oder *Flowsorting* (z.B. Speicher *et al.*, 1996). Pcp-Sonden werden ebenfalls über eine Mikrosezierung mit Glasnadeln (z.B. Bates *et al.*, 1986) oder Laser (z.B. Monajembashi *et al.*, 1986) gewonnen.

Verwendet man lokusspezifische Sonden, so können bestimmte Chromosomenbereiche, Gene oder definierte DNA-Sequenzen sichtbar gemacht werden. Sie enthalten DNA-Abschnitte, die in Vektoren kloniert werden können. Als Vektoren fungieren beispielsweise künstliche Bakterienchromosomen (*Bacterial Artificial Chromosome*, BAC; Shizuya *et al.*, 1992). Sie haben ihren Ursprung im Fertilitätsplasmid von *Escherichia coli* und liegen als extrachromosomale, ringförmige und sich



autonom vermehrende, doppelsträngige DNA-Moleküle vor. Sie können als Vektoren humane DNA-Fragmente bis 300 kb Länge aufnehmen. Damit besteht die Möglichkeit des Einbaus spezifischer DNA in einen solchen Vektor und dessen Vermehrung in einem geeigneten Wirtsorganismus (*E. coli*). Nach der anschließenden Isolierung der Plasmid-DNA aus den Bakterien, kann die DNA über eine DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide primer-PCR*, PCR mit degenerierten Oligonukleotidprimern; Telenius *et al.* 1992) isoliert werden. Mit dieser Methode ist eine Vermehrung von DNA mit unbekannter Sequenz möglich. Anschließend kann die amplifizierte DNA markiert werden und als lokusspezifische Sonde in der FISH eingesetzt werden (siehe 1.2.). Im Rahmen des „*Human Genome Project*“ wurde eine „BAC-Kartei“ erstellt, die fast das gesamte menschliche Genom abdeckt. Anhand dieser Karte kann man über das Internet für fast jede beliebige Region des Genoms BACs auswählen, diese bei verschiedenen Anbietern bestellen und als FISH-Sonden einsetzen.

### 1.2.3 Weiterentwicklungen der FISH

Entscheidend für die Etablierung und weite Verbreitung der FISH waren zahlreiche Weiterentwicklungen dieser Methode. So stellte Nederlof 1989 erstmals gleichzeitig drei Nukleinsäuresequenzen mit drei verschiedenen Farbstoffen in einem Experiment dar. Im Jahre 1996 gelang dann sogar die gleichzeitige Darstellung aller 24 Chromosomen einer menschlichen Zelle in 24 verschiedenen Farben in einer Hybridisierung (Speicher *et al.*, 1996; Schröck *et al.*, 1996). Die Methoden bezeichnet man in Abhängigkeit von der Auswertungstechnik als „Multiplex-FISH“ (M-FISH) und „*Spectral Karyotyping*“ (SKY). Die dafür verwendeten wcp-Sonden werden mit fünf (Speicher *et al.*, 1996; Schröck *et al.*, 1996), sechs (Tanke *et al.*, 1998) oder sieben (Azofeifa *et al.*, 2000) verschiedenen Fluorochromen markiert. Jede der 24 verschiedenen wcp-Sonden wird mit einer unterschiedlichen Kombination von Fluorochromen markiert. Die Aufnahme der FISH-Signale erfolgt bei M-FISH an einem Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera (*charge coupled device*-Kamera) und geeigneten Fluoreszenz-Filtern. Bei SKY wird zur Messung ein Interferometer verwendet, welches das gesamte emittierte Lichtspektrum jedes Bildpunktes misst. Beiden Methoden ist eine geeignete Software zum Auswerten der Ergebnisse nachgeschaltet.

M-FISH und SKY werden beispielsweise für den Nachweis der an Translokationen beteiligten Chromosomen oder der Bestimmung der Herkunft von Markerchromosomen genutzt. Methodisch bedingt ist es jedoch nicht möglich, Bruchpunkte zu bestimmen und intrachromosomale Veränderungen, wie z.B. kryptische Deletionen oder Inversionen (ohne Verschiebung des Zentromerindexes) bleiben unerkannt.

### 1.2.4 FISH-Bänderungsmethoden

Die Entwicklung von FISH-Bänderungsmethoden hob die oben beschriebenen, methodisch bedingten Grenzen von M-FISH bzw. SKY auf. Dadurch war es möglich, chromosomale Subbanden auf FISH-Ebene zu unterscheiden (Überblick in Liehr *et*

*al.*, 2002a, 2006). Gegenwärtig gibt es für die menschlichen Chromosomen neun verschiedene Bänderungsmethoden. Die wichtigsten werden im Folgenden vorgestellt.

Anfang der 90er Jahre führten Lengauer und Mitarbeiter die Technik des Chromosome-Barcodes ein (Lengauer *et al.*, 1992, 1993). Hierfür werden YAC-Sonden (*Yeast Artificial Chromosome*, YAC, künstliches Hefechromosom) mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert, die ein spezifisches Bandenmuster auf dem jeweiligen Chromosom erzeugen. Die Auflösung ergibt sich durch die Größe der eingesetzten Sonden und deren Abstand zueinander (ca. 0,3-1 Mb).

Die Methode der RX-FISH wird auch als „*cross species color banding*“ bezeichnet und verwendet von zwei Gibbonarten chromosomenspezifische DNA nach Flowsorting, die in drei Gruppen aufgeteilt und mit drei verschiedenen Fluorochromen markiert werden (Müller *et al.*, 1998). Die Gibbonchromosomen weisen im Vergleich zum menschlichen Karyotyp evolutionär bedingte, komplexe Veränderungen auf und erzeugen dadurch ein Bandenmuster auf menschlichen Chromosomen. Eine Auflösung von 80-90 Banden pro haploiden, humanen Karyotyp kann erreicht werden (Müller *et al.*, 2000). Wird RX-FISH mit einem Set aus 110 Mensch-Hamster somatischen Zellhybriden kombiniert, führt dies zu einer Auflösung von ca. 160 Banden pro haploiden Karyotyp (Müller und Wienberg, 2001).

Eine weitere Bänderungsmethode ist das hochauflösende Vielfarb-Bänderungsverfahren (high resolution multicolor banding, MCB). Es stellt eine methodische Weiterentwicklung des M-FISH dar. Es wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena entwickelt und erstmals von Chudoba *et al.* 1999 für das Chromosom 5 beschrieben. Bei diesem Verfahren beschränkt man sich auf ein Chromosom und erstellt mittels Mikrosezierung drei bis elf überlappende, regionsspezifische DNA-Banken in Abhängigkeit von der Größe des Chromosoms. Diese DNA-Banken werden mit fünf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zusammen in einem Experiment hybridisiert. Bei der Auswertung bedient man sich der Computersoftware ISIS des Herstellers Metasystems. Diese ermittelt die Fluoreszenzanteile jedes Chromosomenabschnittes und erzeugt definierte Pseudofarben für jede Region des Chromosoms. Die Pseudofarben basieren auf den sich ändernden Fluoreszenzprofilen entlang des Chromosoms, wodurch in Bezug auf die GTG-Bänderung ein Bandenniveau von 550 Banden und mehr pro haploiden Chromosomensatz erreicht werden kann (Chudoba *et al.*, 1999; Lemke *et al.*, 2001). Die MCB-Methode hat den Vorteil, dass sie ein reproduzierbares Pseudobandenmuster erzeugt, das für ein und dieselbe Hybridisierung mit Hilfe der ISIS Software bis zu einer Auflösung von 800 Banden pro haploiden Chromosomensatz variiert werden kann (Liehr *et al.*, 2002b; Weise *et al.*, 2002).

Mittlerweile stehen 138 regionspezifische DNA-Sonden für das gesamte menschliche Genom am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena zur Verfügung (Mrasek *et al.*, 2001; Liehr *et al.*, 2002b). Die regionspezifischen DNA-Sonden aller 24 menschlichen Chromosomen wurden zu einem Probenansatz kombiniert und stehen als ein FISH-Ansatz zur Verfügung. Dieses so genannte multitude multicolor banding (mMCB, Weise *et al.*, 2003) bietet den Vorteil der Kosten- und Zeitersparnis, da sich in nur einem FISH-Experiment die MCB-spezifischen Färbungen aller menschlichen Chromosomen realisieren lassen. Es eignet sich sowohl für die

Anwendung in der klinischen Diagnostik als auch in der Forschung und wurde bereits erfolgreich für ZOO-FISH (Weise *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2006) und Studien der Interphasestruktur (Lemke *et al.*, 2002; Weise *et al.*, 2002a) eingesetzt.

### 1.2.5 Weitere Methoden

#### 1.2.5.1 CGH

Bei der vergleichenden genomische Hybridisierung (*comparative genomic hybridization*, CGH) handelt es sich eine molekularzytogenetische Methode, bei der Fluoreszenzintensitäten zweier genomischer DNA-Proben quantitativ miteinander verglichen werden (Kallioniemi *et al.*, 1992). Es wird unterschieden zwischen Metaphasen-CGH (*micro-CGH*) (Kallioniemi *et al.*, 1992) und Array-CGH (Pinkel *et al.*, 1998). Bei beiden Verfahren wird die zu testende Patienten-DNA (z.B. aus einem Tumor) und die Referenz-DNA einer Kontrollperson isoliert, mit unterschiedlichen Fluorochromen markiert und im Verhältnis 1:1 gemischt. Bei der Metaphasen-CGH werden beide DNA-Sonden gleichzeitig unter Suppressionsbedingungen auf Metaphasechromosomen der Kontrollperson hybridisiert. Im Gegensatz dazu erfolgt die Hybridisierung der Array-CGH auf einem Microarray. Hierbei handelt es sich um einen Glasobjektträger auf dessen Oberfläche sich die Ziel-DNA nicht in Form ganzer Metaphasechromosomen sondern definierter, kleiner Fragmente befindet. Die Fragmente sind so ausgewählt, dass sie das menschliche Genom möglichst gleichmäßig abdecken. Nach der Hybridisierung wird bei beiden Verfahren das Hybridisierungsmuster der DNA-Sonden verglichen. Hierfür werden die Fluoreszenzsignale mit Hilfe einer Kamera und entsprechender Filtern auf den Computer übertragen. Computerprogramme ermöglichen dann die exakte Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten und zeigen eine Über- oder Unterrepräsentation der Patienten-DNA an. Durch die große Zahl der verwendeten DNA-Fragmente lässt sich das Auflösungsvermögen der Array-CGH im Vergleich zur konventionellen Metaphasen-CGH enorm steigern.

#### 1.2.5.2 Mikrosezierung

Eine weitere Methode ist die Mikrosezierung. Dabei handelt es sich um eine Technik, bei der ganze Chromosomen oder Chromosomenfragmente mit Hilfe einer Glasnadel (Senger *et al.*, 1997) oder eines Lasers (z.B. Monajembashi *et al.*, 1986) isoliert werden können. Die gesammelten Objekte werden anschließend über eine PCR amplifiziert und als FISH-Sonden eingesetzt. Diese Technik findet beispielsweise Anwendung in der Bestimmung der chromosomalen Herkunft von Markerchromosomen und der Chromosomen, die in Translokationen involviert sind. Ebenfalls ist eine Bruchpunktbestimmung von Translokationen möglich. Weiterhin werden über diese Technik DNA-Sonden hergestellt, welche dann für verschiedene FISH-Methoden (z.B. MCB, siehe 1.3.4) eingesetzt werden können.

Eine Weiterentwicklung ist die FISH-Mikrosezierung (Weimer *et al.*, 2000), bei der die zu sammelnden Chromosomen über glasnadelbasierende Mikrosezierung vorher in einer FISH-Hybridisierung mit einer fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde markiert

werden. Diese Technik findet Anwendung bei der Bestimmung der chromosomalen Zusammensetzung, der Herkunft und der Bruchpunkte von aberranten Chromosomen.

### 1.3 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Erkrankung hämatopoetischer Zellen. Sie entsteht durch genetische Veränderungen, welche die normale Regulation von Wachstum, Differenzierung und Apoptose hämatopoetischer Zellen unterbrechen. In Folge dessen kommt es zu einer Akkumulation teilungsfähiger, reifungsgestörter leukämischer Zellen im Knochenmark. Diese Zellen entsprechen lichtmikroskopisch den Myeloblasten und werden deshalb als leukämische Blasten bezeichnet. Die Folge der Zellexpansion ist eine Verdrängung der normalen Hämatopoese ([www.kompetenznetz-leukämie.de](http://www.kompetenznetz-leukämie.de), Stand April 2008).

Die AML tritt in allen Altersgruppen auf, kommt jedoch häufiger im Erwachsenenalter vor. Der Altersmedian liegt bei ca. 60 Jahren. Die Inzidenz für die AML beträgt 3,8/100.000 pro Jahr mit einem leicht höheren Männeranteil ([www.dgho.de](http://www.dgho.de), Stand April 2008). Die Einteilung der AML erfolgt anhand eines breiten Spektrums diagnostischer Verfahren. Aktuelle Standards für diese Verfahren hat das *Kompetenznetz akute und chronische Leukämien* definiert ([www.kompetenznetz-leukämie.de](http://www.kompetenznetz-leukämie.de), Stand April 2008). Als Standard der AML-Diagnose fungiert die Zytomorphologie. Dafür werden Ausstriche eines Knochenmarkaspirates des Patienten benötigt und färberisch dargestellt, um leukämische Blasten zu identifizieren. Zur weiteren Differenzierung der Blasten werden obligat zytochemische Färbungen durchgeführt. Neben Zytomorphologie und Zytochemie ist die Immunphänotypisierung im Rahmen der Diagnostik ebenfalls obligat und dient der Diagnosesicherung. Ausgangsmaterial sind Zellen, die aus Knochenmark oder Blut des Patienten gewonnen werden. Diese Zellen werden mit monoklonalen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die gegen Zelloberflächenantigene gerichtet sind, markiert. Der letzte obligate Schritt in der Diagnosestellung ist die Zytogenetik. Sie kann zur Diagnosesicherung beitragen und besitzt eine enorme prognostische Bedeutung, denn das Wissen über den Karyotypen der Blasten bildet die Grundlage für eine risikoadaptierte Therapie (Heilmeier *et al.*, 2007). Neben dem Einsatz im Rahmen der Erstdiagnose wird die Zytogenetik auch für die Messung des Therapieerfolges und im Falle eines Rezidivs zum Nachweis sekundärer Aberrationen eingesetzt. Das Untersuchungsmaterial ist Knochenmarkaspirat oder seltener mit Heparin versetztes Blut (Heilmeier *et al.*, 2007). Große AML-Studien führten zu einer Einteilung der AML-Fälle in drei definierte Prognosekategorien, die auf Grund von zytogenetischen Erstdiagnosen erstellt wurden (Grimwade *et al.*, 1998, 2001; Slovak *et al.*, 2000; Byrd *et al.*, 2002). Mit einer günstigen Prognose assoziiert sind die Translokationen t(8;21) und t(15;17) sowie die perizentrische Inversion am Chromosom 16. Eine ungünstige Prognose signalisieren partielle oder totale Monosomien 5 bzw. 7 oder komplex aberrante Chromosomensätze, bei denen mehr als drei Chromosomen involviert sind (Fonatsch und Krömer, 2005). Etwa die Hälfte aller *de novo* entstandenen AML zeigen einen zytogenetisch normalen Karyotyp (z.B. Bacher *et al.*, 2006; Mrózek *et al.*, 2004) und sind mit einer

intermediären Prognose korreliert. Ebenfalls zur intermediären Gruppe zählen die AML mit Trisomie 8 als einzige Aberration. Im Rahmen der Diagnostik der AML ist die FISH als ergänzende Methode zur Zytogenetik zu sehen.

Einen Einsatz in der Diagnostik finden ebenfalls molekulargenetische Methoden. Vorteil dieser Methoden ist ihre Sensitivität. Submikroskopische Veränderungen, die unterhalb des Auflösungsvermögens der Zytogenetik liegen, können nachgewiesen werden. Die verwendeten Methoden sind vor allem die Polymerasekettenreaktion und DNA-Microarrays (Haferlach *et al.*, 2006; Heilmeier *et al.*, 2007).

Die Einteilung der AML in Subgruppen erfolgt nach der FAB-Klassifikation (*French-American-British*) (siehe Tab. 37 im Anhang). Sie beruht im Wesentlichen auf morphologischen und zytochemischen Kriterien und wurde durch die Immunophänotypisierung teilweise ergänzt. Im Jahre 2000 wurde von der WHO (*World Health Organization*) eine neue Klassifikation vorgeschlagen, die eine Kombination der bisher im Rahmen der FAB-Klassifikation verwendeten Methoden mit der Zyto- und Molekulargenetik vorsieht. Beide Klassifikationen sind gegenwärtig in der Diagnostik gebräuchlich (Heilmeier *et al.*, 2007).

### 1.3.1 AML mit zytogenetisch normalem Karyotyp

Bei ca. 45 % der Patienten mit *de novo* AML sind zytogenetisch keine Veränderungen erkennbar, der Karyotyp ist normal (NK-AML) (z.B. Bacher *et al.*, 2006; Mrózek *et al.*, 2004). Zusätzlich können bei der NK-AML verschiedene molekulargenetische Veränderungen auftreten, wie beispielsweise neben Längenmutationen des *FLT3* Gens (z.B. Schnittger *et al.*, 2002), auch Mutationen im *MLL* (z.B. Döhner *et al.*, 2002; Shiah *et al.*, 2002) und *NMP1* Gen (z.B. Boissel *et al.*, 2005; Döhner *et al.*, 2005). Jedoch ist bislang noch nicht geklärt, ob diesen Mutationen eine direkte pathogenetische Bedeutung bei der Entstehung der NK-AML zukommt (Christ *et al.*, 2007). Weiterhin wurden in neuesten Studien segmentale uniparentale Disomien bei NK-AML nachgewiesen (Fitzgibbon *et al.*, 2005; Raghaven *et al.*, 2005; Gorletta *et al.*, 2005). Hierbei handelt es sich um Homozygotisierungen, die nur in einzelnen Chromosomenregionen beschrieben wurden und deren Bedeutung in Bezug auf die Entstehung der AML noch nicht näher untersucht wurde. Ebenfalls können bei der NK-AML sekundäre Veränderungen auftreten. Am häufigsten erfolgt ein Zugewinn des Chromosoms 8 (s.u.).

### 1.3.2 AML mit Trisomie 8

Die Trisomie 8 ist die am häufigsten auftretende Trisomie bei AML (Heim und Mitelman, 1995; Paulsson *et al.*, 2001) und kommt als alleinige Karyotypveränderung oder im Zusammenhang mit anderen Chromosomenaberrationen vor (Heim und Mitelman, 1995; Mrózek *et al.*, 1997). Die Trisomie 8 hat keine Präferenz für eine bestimmte FAB-Klassifikation (Cuneo *et al.*, 1998; Wolman *et al.*, 2002) und ihre Prognose ist abhängig von zusätzlichen Aberrationen (Schoch *et al.*, 1997). So stellt eine Trisomie 8 mit einer komplexen Karyotypveränderung für den Patienten eine ungünstige Prognose dar. Ebenso scheint die Trisomie 8 nicht die günstige Prognose zu beeinflussen, wenn sie zusammen mit Veränderungen des Karyotyps auftritt, die

dieser Gruppe zugeordnet werden. Eine AML mit Trisomie 8 als einzige Aberration zeigt dagegen eine intermediäre Prognose (Schoch *et al.*, 1997).

## 1.4 Strukturelle Varianten im menschlichen Genom

Das menschliche Genom umfasst die gesamte genetische Information der menschlichen Zellen (Strachan und Read, 2005). Es besteht aus dem Kerngenom und dem Mitochondriengenom. Letzteres wird durch einen kurzen ringförmigen DNA-Doppelstrang, der 37 Gene enthält, gebildet. Das wesentlich komplexere Kerngenom verteilt sich auf 24 verschiedene Chromosomen, welche lineare doppelsträngige DNA Moleküle bilden, und enthält ca. 25.000 Gene.

Strukturelle Varianten im menschlichen Kerngenom sind definiert als genomische Veränderungen, die Abschnitte von DNA größer als 1 kb involvieren (Feuk *et al.*, 2006). Sie können entweder mikroskopisch oder submikroskopisch sichtbar gemacht werden.

### 1.4.1 Mikroskopisch sichtbare Varianten

Die Entwicklung der Bänderungsmethoden von Chromosomen in der Zytogenetik (siehe 1.2) führte zu einer raschen Identifizierung unterschiedlicher struktureller Varianten in den menschlichen Chromosomen, die auch als Heteromorphismen bezeichnet werden (Jacobs, 1977). Diese Varianten befinden sich überwiegend in den Satellitenregionen der akrozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 sowie im Heterochromatin des Chromosoms Y. Weiterhin können sie im Zentromerbereich und im zentromernahen Heterochromatin aller Chromosomen auftreten. Die Varianten betreffen insbesondere Regionen im Genom, welche repetitive DNA-Sequenzen enthalten und genarm sind und gelten daher als klinisch nicht relevant. Weitere mikroskopisch sichtbare Varianten sind Translokationen, Deletionen, Duplikationen, Insertionen und Inversionen (z.B. Jacobs *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1999; <http://www.ngrl.org.uk/Wessex/collection>, Stand April 2008).

### 1.4.2 Submikroskopisch sichtbare Varianten

Vor dem Jahre 2004 waren nur wenige submikroskopisch sichtbare Varianten in der Literatur dokumentiert. Dabei handelte es sich größtenteils um Insertions-Deletions-Polymorphismen und kryptische Aberrationen der Subtelomerregionen (Feuk *et al.*, 2006). Die Ursache für diese geringe Anzahl gründet in der damals fehlenden Methode für genauere Untersuchungen. Diese Limitierung wurde mit der Entwicklung der Microarrays behoben (Pinkel und Albertson, 2005) (siehe 1.3.5), was zu einem sprunghaften Anstieg der Anzahl der Varianten führte. Seit 2004 sind nun fast 30.000 submikroskopische Strukturvarianten publiziert und in der „Database of genomic variants“ im Internet öffentlich zugänglich (<http://projects.tcag.ca/variation>, Stand April 2008). Eine der häufigsten Varianten wird als „copy number variations“ (CNVs) oder „copy number polymorphisms“ (CNP) bezeichnet. Sie werden definiert als ein Bereich an DNA, der mindestens 1 kb groß ist und im Vergleich zu einem Referenzgenom in einer variablen Kopienanzahl auftritt (Redon *et al.*, 2006). Die

Varianz entsteht durch Deletionen, Duplikationen oder Insertionen von DNA-Segmenten, also einem Verlust oder Zugewinn von DNA-Bereichen. CNVs sind gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt und decken ca. 12 % der genomischen DNA ab (Carter, 2007) (siehe Abb. 26 im Anhang). Sie wurden erstmals 2004 von zwei Gruppen unabhängig voneinander publiziert (lafrate *et al.*, 2004; Sebat *et al.*, 2004). Interessanterweise befindet sich ein Großteil der CNVs (ca. 25-50 %, abhängig von der Publikation) in Regionen mit segmentalen Duplikationen (Feuk *et al.*, 2006). Dies sind Blöcke von DNA mit einer Größe von 1-400 kb, welche an vielen Stellen innerhalb des Genoms auftreten und sich in mehr als 90 % ihrer Sequenz gleichen (Eichler *et al.*, 2001). Sharp und Mitarbeiter postulierten 2005, dass segmentale Duplikationen als „Hot spots“ für die Entstehung von CNVs gelten könnten.

Bei den submikroskopischen Inversionen handelt es sich um eine weitere Gruppe der strukturellen Varianten, die überwiegend entdeckt wurden, weil sie in menschliche Krankheiten involviert sind. Über Inversionen in der Normalbevölkerung ist allerdings bisher wenig bekannt, da eine geeignete Untersuchungsmethode fehlt. Sie sind balanciert und nicht verbunden mit einem Verlust oder Zugewinn an DNA.

Neben den CNVs und Inversionen sind zwei weitere submikroskopische Varianten bekannt: die kryptischen Translokationen und die segmentalen uniparentalen Disomien (UPD) (Feuk *et al.*, 2006). Die erste Variante, die kryptische Translokation, kann gegenwärtig nur durch FISH oder direkten Sequenzvergleich nachgewiesen werden. Die zweite Variante, die UPD, liegt vor, wenn beide homologe Chromosomen eines Individuums von einem Elternteil stammen. Es wird unterschieden zwischen Isodisomie (Vorhandensein von zwei Kopien von einem der beiden mütterlichen oder väterlichen Chromosomen) und Heterodisomie (Vorhandensein beider elterlicher homologer Chromosomen). Der Nachweis erfolgt mittels SNP-Arrays (*single nucleotide polymorphisms Arrays*), die Veränderungen eines einzelnen Nukleotids in der DNA-Sequenz nachweisen können, oder mittels Mikrosatelliten-PCR. Bei Mikrosatelliten handelt es sich um „kurze Folgen von tandemartigen Wiederholungen einer einfachen Sequenz (kleiner als 10 bp)“, die verteilt über das gesamte Genom vorkommen (Strachan und Read, 2005). Diese Mikrosatelliten-DNA dient als Primer für die PCR und ermöglicht die Unterscheidung der homologen Chromosomen in Form von mütterlichen und väterlichen Allelen.

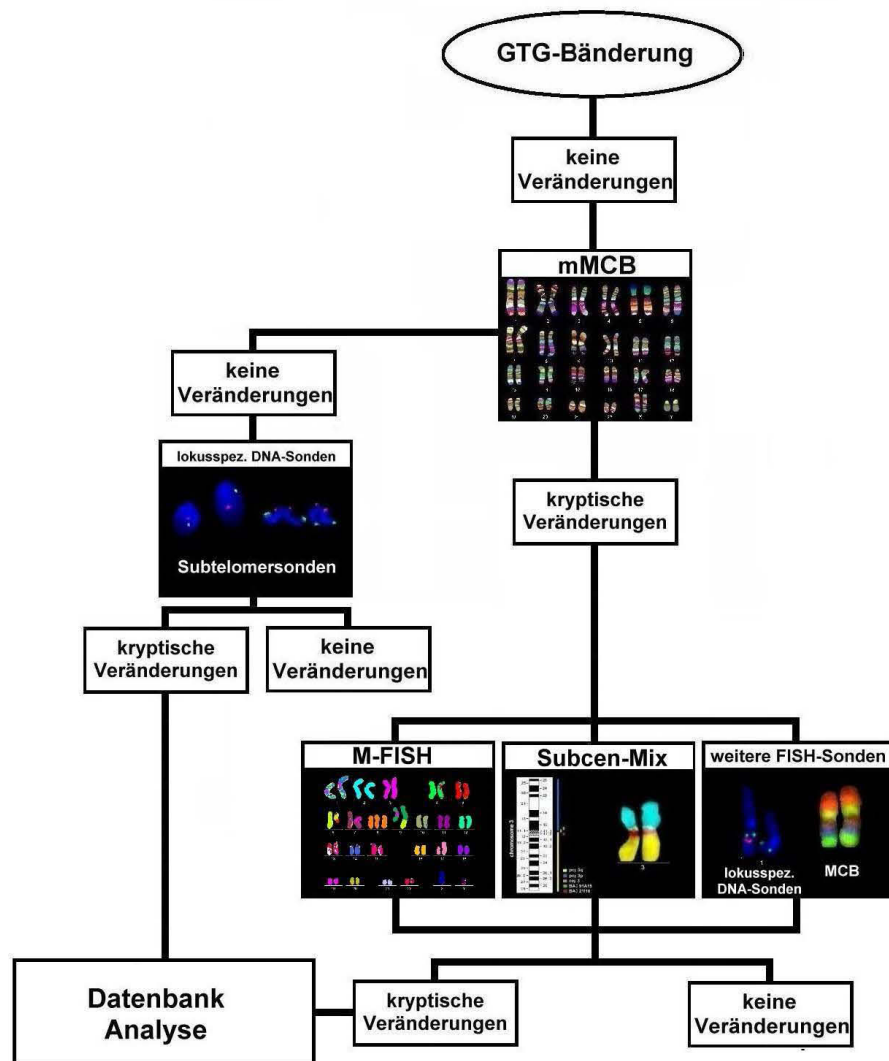
## 1.5 Zielstellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung kryptischer Aberrationen bei AML-Fällen mit zytogenetisch normalem Karyotyp sowie AML-Fällen mit Trisomie 8 als einzige Chromosomenaberration. Beiden ist gemeinsam, dass sie einer intermediären Risikogruppe zugeordnet werden, die eine Voraussage über die Prognose und eine individuelle Therapieplanung für die Patienten gegenwärtig nicht zulässt. Dabei sind zytogenetische Marker neben dem Alter des Patienten die wichtigsten prognostischen Faktoren für eine individuelle Therapieplanung und dienen als Verlaufskontrollen zur Beurteilung des Genesungserfolges. Weiterhin zeigen die Knochenmarkchromosomen für die zytogenetische Diagnostik eine schlechte Morphologie, welche eine Untersuchung mit einem Bandenniveau von

höchstens 200-300 Banden pro haploiden Karyotyp ermöglicht. Hierbei könnte es durchaus möglich sein, dass kryptische Aberrationen, wie z.B. Deletionen oder Translokationen, auf Grund der Morphologie der Chromosomen nicht erkennbar sind. Somit war das Ziel dieser Arbeit, mit den gegenwärtig modernsten molekular-zytogenetischen Methoden Chromosomenaberrationen zu identifizieren und charakterisieren, die möglicherweise prognoserelevante Marker sein könnten (siehe Abb. 2). Hierfür werden mit der Methode des mMCB die sich in Kultur teilenden, also die proliferierenden Zellen untersucht. Weiterhin wird mit Hilfe lokusspezifischer FISH-Sonden ebenfalls in den nicht proliferierenden Zellen nach Aberrationen gesucht, da diese bei der zytogenetischen Routinediagnostik nicht mit einbezogen werden können. Bei AML-Fällen mit Trisomie 8 ist der Zugewinn des Chromosoms 8 häufig eine sekundäre Aberration, die nicht prognoserelevant zu sein scheint. In der vorliegenden Arbeit wurde bei AML-Fällen mit Trisomie 8 als alleinige Aberration nach primären Veränderungen gesucht, die einen Einfluss auf die Prognose haben könnten. Weiterhin wurde geprüft, ob ein Einsatz des mMCB in der Routinediagnostik von AML-Fällen mit normalem Karyotyp sinnvoll wäre.

Tumore stellen klonale Veränderungen dar, d.h. sie haben ihren Ursprung in einer Zelle, die nach einer genetischen Veränderung unkontrolliert proliferiert. Bei der zytogenetischen Diagnostik liegt für jeden Tumor ein Gemisch an gesunden Zellen und tumorassoziierten Zellen vor. Diese Zellen sind bei AML-Fällen mit normalem Karyotyp nicht voneinander unterscheidbar. Deshalb wurde im zweiten Teil der Arbeit die Etablierung einer neuen FISH-Methode durchgeführt (pod-FISH, *parental origin determination*-FISH), mit der es erstmals möglich ist, homologe Chromosomen auf Einzelzellniveau anhand von Polymorphismen in CNV-Regionen zu unterscheiden. Diese neu etablierte Methode wurde anschließend auf AML-Fälle mit zytogenetisch normalem Karyotyp sowie AML-Fällen mit Trisomie 8 als einzige Chromosomenaberration angewendet. Das Ziel dieser Untersuchungen ist zu klären, ob leukämische Marker in Form von Polymorphismen in den CNV-Regionen existieren, mit Hilfe derer die Tumorzellen eindeutig identifiziert werden können. Ein weiteres Ziel ist es, segmentale UPDs, wie sie bei AML bereits beschrieben wurden (siehe 1.4.1.1), in Einzelzellen nachzuweisen und so möglicherweise einen Hinweis auf epigenetische Veränderungen zu bekommen. Weiterhin wurde erstmalig bei AML-Fällen mit Trisomie 8 die Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 auf Einzelzellniveau bestimmt.





**Abb. 2:** Verwendetes Schema zur Identifizierung kryptischer Aberrationen bei AML mit zytogenetisch unauffälligem Karyotyp.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Untersuchungsmaterialien und Chromosomenpräparation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungsmaterialien in Form von peripherem Blut oder Knochenmark verwendet. Sie stammen aus dem Klinikum der Friedrich-Schiller Universität Jena. Die Chromosomenpräparation erfolgte in der zytogenetischen Abteilung des Instituts für Humangenetik und Anthropologie, Jena nach Standardprotokoll (Verma und Babu, 1994). Die aufgearbeiteten Proben wurden bei -20°C gelagert.

Es wurden aus den asservierten etwa 4500 Leukämie-Zellsuspensionen Proben von 31 Patienten, bei denen eine *de novo* AML mit zytogenetisch normalem Karyotyp als Ersteinsendung beschrieben wurde. Dieser Befund wurde bei einem Bandenniveau von 200-300 Banden pro haploiden Karyotyp erstellt. Zusätzlich wurden hier 13 Knochenmarkproben von Patienten mit AML und Trisomie 8 als einzige Chromosomenaberration untersucht. Die Daten aller verwendeten Fälle sind in den Tabellen 38 und 39 im Anhang aufgelistet. Die Patienten mit NK-AML (siehe 1.4.1) hatten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ein Durchschnittsalter von 55 Jahren. Es waren 22 männliche Patienten und neun weibliche Patienten vertreten, was einen männlich-weiblich Quotienten von 2,4 ergibt. Die FAB-Klassifikation (siehe 1.4.1) zeigte folgende Verteilung: 24 % AML-M1, 23 % AML-M2, 3 % AML-M3, 20 % AML-M4, 3 % AML-M5b, 10 % AML-M6, 7 % AML-M0 und 13 % AML aus MDS (siehe Abb. 27 im Anhang). Die Anzahl der Blasten variierte von 10-100 %. Die AML-Patienten mit Trisomie 8 waren bei Erstdiagnose durchschnittlich 57 Jahre alt. Die Geschlechterverteilung lag bei sechs männlichen und sieben weiblichen Patienten. Dies ergibt einen Quotienten von 0,8. Bei acht Patienten wurde die Diagnose einer AML aus MDS gestellt. Die anderen fünf zeigten eine *de novo* AML, wobei zwei Patienten hinsichtlich der FAB-Klassifikation näher charakterisiert werden konnten und eine AML-M1 bzw. AML-M2 aufwiesen.

Im Rahmen der Etablierung der pod-FISH Methode wurden Proben von externen Einsendern freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Prof. Horsthemke aus Essen sowie F. Jonsrud aus Tromsø, Norwegen). Ein spezieller Fall, der Fall N, wird im Folgenden näher vorgestellt.

#### Fall N

Bei diesem Fall handelte sich um Material eines männlichen Patienten, der im Jahr 2003 in der 26. Schwangerschaftswoche geboren wurde. Er zeigte folgende klinische Symptome:

- atypischer Bauchwanddefekt unklarer Genese (Gastroschisis)
- schwere respiratorische Symptome
- Netzhauterkrankungen
- Hyperinsulismus

- Unterfunktion der Schilddrüse
- Asymmetrisches Überwachstum des subkutanen Fettgewebes

Auf Grund dieser Symptome wurde das Blut des Patienten zytogenetisch untersucht. Es zeigte sich, dass dieser Patient eine Chimäre ist und zwei verschiedene Zelllinien besitzt. In 3 % der Blutzellen wurde ein normaler männlicher Karyotyp (46,XY) gefunden. Die anderen 97 % der Zellen zeigten einen weiblichen Karyotyp (46,XX). Das Ergebnis der angeschlossenen Mikrosatellitenanalyse ergab eine paternale Isodisomie aller 23 Chromosomen in den weiblichen Zellen.

### 2.1.1 Verwendete Reagenzien für die Chromosomenpräparation

#### *Aqua dest.*

mit Seralpur Delta (Seral) hergestelltes Reinstwasser (deionisiert, organisch rein, partikelfrei), zusätzlich autoklaviert

#### Colcemid (Seromed)

Stammlösung mit 10 µg/ml

#### Fixativ

Methanol (Merck) : Eisessig (Merck) = 3 : 1

#### Kaliumchlorid-Lösung (hypoton)

KCl (Merck) 0,56 %  
in *Aqua dest.*

#### 1× PBS (*phosphate buffered saline*)

PBS Dulbecco (9,55 g/l, Seromed)  
in *Aqua dest.*

#### Phytohämagglutinin (PHA)

lyophilisiertes PHA (Seromed) in 5 ml *Aqua dest.* lösen,  
aliquotieren und bei –20°C lagern

#### RPMI 1640 (Wachstumsmedium)

RPMI 1640 mit Glutamax Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin (Gibco)  
Fetales Kälberserum (Biochrom KG) 12 %  
Penicillin (100000 U/ml) / Streptomycin (10000 U/ml) (Biochrom KG) 1 %

### 2.1.2 Chromosomenpräparation aus Vollblut

Zur Präparation von Chromosomen aus Vollblut wurde peripheres humanes Blut, versetzt mit dem Gerinnungshemmer Heparin, verwendet. Die Kultivierung der Blutzellen erfolgte in einer sterilen Kulturflasche (Cellstar, Greiner), in die 10 ml des Wachstumsmediums RPMI 1640 und 100 µl des Mitogens Phytohämagglutinin (PHA)

gegeben wurden. PHA stammt aus *Phaseolus vulgaris* und stimuliert spezifisch T-Lymphozyten, während es keine Wirkung auf B-Zellen hat. In die Kulturflasche wurde pro Ansatz 1 ml heparinisiertes Blut gegeben. Die Kultivierung erfolgte für 72 h bei 37°C im Brutschrank. 1 h 30 min vor Abbruch der Kultivierung wurde in jede Kulturflasche 100 µl Colcemid pipettiert. Dieses Derivat des Alkaloids Colchecin wird aus *Colchicum autumnale* gewonnen. Es dient als starkes Mitosegift, da es die Ausbildung des Spindelapparates der Zellen während der Zellteilung verhindert. Die Zellteilung wird im Metaphasestadium arretiert.

Zur Aufarbeitung wurden die Zellkulturen in den Flaschen vorsichtig aufgeschüttelt, so dass sich alle Zellen vom Boden ablösten. Die Kulturflüssigkeit wurde in 15 ml Falcon Röhrchen überführt und anschließend 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Resuspendierung des Rückstandes in dem Röhrchen erfolgte durch Zugabe von 10 ml einer, vorher auf 37°C erwärmten, hypotonen KCl-Lösung und kräftigem Schütteln. Eine Inkubation für 20 min bei 37°C wurde anschließend durchgeführt. Hieraus folgten eine Lyse der Erythrozyten und eine daraus resultierende Hämolyse. Die Fixierung wurde mit 1 ml 4°C kalten Fixativs eingeleitet. Nach der Resuspendierung erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 1200 U/min. Der Überstand, in dem sich die hämolysierten Erythrocyten befanden, wurde abgenommen. Dem Sediment wurde 10 ml 4°C kaltes Fixativ zugegeben und erneut für 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Diese Waschvorgänge wurden insgesamt 2 mal wiederholt. Beim letzten Waschschritt wurde die Suspension zusammen mit dem Fixativ für 30 min bei -20°C bzw. über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Dadurch wurde eine vollständige Denaturierung der Proteine erreicht. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment, abhängig von seiner Dichte, mit ca. 1 ml Fixativ versetzt. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei -20°C aufbewahrt. Die Lagerung bei -20°C hat den Vorteil, dass die DNA-schädigende Wirkung des Fixativs (durch die Essigsäure kann es zu Depurinierung und daraus folgenden Doppelstrangbrüchen in der DNA kommen) möglichst gering gehalten wird.

### 2.1.3 Chromosomenpräparation aus Knochenmark

Zur Kultivierung des Knochenmarks wurden 3-5 ml heparinisiertes Knochenmark verwendet. Die Kultivierungsdauer war unterschiedlich (Direktpräparation, 24 h, 24 h Colcemid Kultur, 48 h, 72 h) und abhängig von der Diagnose. Für die vorliegende Arbeit wurden hauptsächlich 24 h Colcemid Kulturen verwendet. Da sich die Zellen im Knochenmark kontinuierlich teilen, war eine Zugabe von PHA nicht notwendig.

In der Kulturflasche erfolgte eine Bestimmung der Zellzahl. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml mit RPMI 1640 auf 10 ml Endvolumen eingestellt. 15 min vor Abbruch der Kultivierung wurde 100 µl Colcemid zugegeben und die Zellen in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Die weiteren Schritte erfolgten analog der Lymphozytenkultivierung (siehe 2.1.2).

### 2.1.4 Präparation der Objektträger für FISH

Das Auftropfen der Zellsuspension erfolgte auf Objektträgern (OT) der Firma Menzel (Superfrost). Die OT wurden vor der Benutzung mit Seidenpapier gereinigt und in *Aqua dest.* bei 4°C gekühlt. Eine feuchte Kammer wurde für ca. 15 min im 60°C warmen Trockenschrank erwärmt. Dieses geschaffene Mikroklima erhöhte die Luftfeuchtigkeit während des Auftropfens (Hliscs *et al.*, 1997). Die kalten OT wurden schräg in die feuchte Kammer gestellt und die Zellsuspension mit einer Pipette aufgetropft (ca. 40 µl). Anschließend wurde Fixativ nachgetropft, das zu einem Abspülen der Plasmareste und einer weiteren Fixierung der Zellen führte. Dabei verdunstete das Methanol im Fixativ schnell und die Essigsäure konnte ihre hygroskopische Wirkung ausüben. Dies führte zur Aufnahme von Wasser aus der Umgebung und einer Quellung und Sichtbarwerden der Chromosomen (Claussen *et al.*, 2002). Die Trocknung der OT erfolgte auf einer Heizplatte für 3 min bei 50°C. Anschließend wurden die OT in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 95 %, 100 % Ethanol) je 3 min dehydriert.

Der Alterungsprozess der OT ist für ein gutes FISH-Ergebnis wichtig. Wenn die OT noch am gleichen Tag für FISH verwendet wurden, inkubierten diese für mindestens 2 h bei 60°C. Ansonsten erfolgte die Alterung der OT bei Raumtemperatur für mindestens 1 bis maximal 7 Tage. Anschließend wurden die OT bei -20°C gelagert.

### 2.1.5 Probenvorbereitung für FISH an Spermien

(nach Bhatt *et al.*, 2007)

Die frische Spermienprobe (ca. 5 ml) wurde in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und mit 1 ml 1x PBS verdünnt. Diese Lösung wurde vorsichtig gemischt, anschließend 8 ml 1x PBS zugegeben und erneut vorsichtig gemischt. Nachfolgend wurde die Probe 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in 1 ml 1x PBS resuspendiert und die Lösung vorsichtig gemischt. Dann erfolgte eine erneute Zugabe von 8 ml 1x PBS und einem gründlichen Mischen. Die Probe wurde noch einmal 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und der Waschschrift wiederholt. Das entstandene Pellet wurde in 1 ml Fixativ resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die OT wurden, wie unter 2.1.4 beschrieben, präpariert.

## 2.2 DNA-Sonden für FISH

### 2.2.1 Mikrosezierungssonden

Die für diese Arbeit verwendeten Mikrosezierungssonden wurden am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena hergestellt und sind in Tab. 1 zusammengefasst (Liehr *et al.*, 2002).

Tab. 1: Zusammenfassung aller verwendeten Mikrosezierungssonden.

DNA - Sonde	Kartierung	Sondenart	Referenz
wcp 1-22, X, Y	ganzes Chromosom	chromosomenspezifisch	Senger <i>et al.</i> , 1998
pcp 1-22; X, Y	p- bzw. q-Arm der Chromosomen	chromosomenarmspezifisch	Liehr und Claussen, 2002
MCB	Chromosomenregion	1. chromosomenspezifische MCB Mixe 2. genomspezifischer mMCB Mix	Mrasek <i>et al.</i> , 2001 Weise <i>et al.</i> , 2003
Midi 54	Chromosomenregion	p-Arme aller akrozentrischen Chromosomen	Mrasek <i>et al.</i> , 2001

### 2.2.2 BAC-Sonden

BACs sind künstliche Bakterienchromosomen, die als extrachromosomale, ringförmige und sich autonom vermehrende, doppelsträngige DNA-Moleküle vorliegen und als Vektoren humane DNA-Fragmente bis 0,3 Mb Länge aufnehmen können (Shizuya *et al.*, 1992). Sie basieren auf einem modifizierten Fertilitätsplasmid (F-Plasmid), dem natürlich vorkommenden Sexfaktor-Plasmiden von *Escherichia coli*. Die Plasmide liegen in relativ geringer Kopienzahl in der Zelle vor. Deshalb trägt das Plasmid ein Gen, das der Zelle die Resistenz gegenüber einem Antibiotikum gewährleistet. Durch diesen hohen Selektionsdruck kann das Plasmid stabil in der Zelle etabliert werden.

Die, in dieser Arbeit verwendeten, BACs wurden entweder im Rahmen des Humanen Genomprojekts bei Chori (BACPAC Resource Center im Children's Hospital Oakland Research Institute, United States) bestellt oder freundlicherweise vom Sanger Center (Wellcome Trust Sanger Center, Hinxton, UK) zur Verfügung gestellt. Sie stammen aus der „Roswell Park Cancer Institute (RPCI)-11 Human Male BAC Library“ (Osoegawa *et al.*, 2001). Hierfür wurde humane DNA in den Vektor pBACe3.6 kloniert. Die Plasmide wurden anschließend in den *E. coli* Stamm DH10B<sup>TM</sup> transformiert.

Die BACs wurden als lokusspezifische Sonden für FISH eingesetzt. Alle verwendeten BACs sind im Ergebnisteil erwähnt und in der Tab. 40 im Anhang aufgeführt.

### 2.2.3 Weitere lokusspezifische Sonden

Neben BACs wurden für diese Arbeit zentromer- und telomerspezifische Sonden verwendet. Diese Sonden sind kommerziell bei den Firmen QBIogene und Abbott erhältlich.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolierung der Plasmid-DNA

#### Verwendete Reagenzien

Chloramphenicol

Stammkonzentration 34 mg/ml in Ethanol

Kanamycin

Stammkonzentration 10 mg/ml in Ethanol

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

10 g Bacto-Trypton (Merck), 5 g Bacto-Yeast Extrakt (Sigma) und 10 g NaCl (Merck)

add 900 ml *Aqua dest.*,

pH-Wert mit 10 M NaOH auf 7,0 einstellen, Auffüllung des Volumens des Mediums auf 1 l mit *Aqua dest.*, autoklavieren

Miniprep Kit (Qiagen)

Puffer P1 (vor Verwendung Zugabe von RNase A (Qiagen, 100 mg/ml) und Lagerung bei 4°C)

Puffer P2, N3, PB und PE

#### Kultivierung der Bakterien

Die *E. coli* Klone wurden in einem LB-Medium-/Argarose-Gemisch in 96-Well-Platten oder Eppendorf Gefäßen verschickt. Das Medium enthielt als Antibiotikum Chloramphenicol (Konzentration: 20 µg/ml) oder Kanamycin (Konzentration: 25 µg/ml).

Das Animpfen der Bakterien erfolgte unter einer sterilen Werkbank im S1-Labor (Sicherheitslabor der Stufe 1 für die gentechnische Arbeit mit Mikroorganismen, die keine Gefahr für gesunde Menschen und die Umwelt darstellen). Dazu wurden in 50 ml Falcon Röhrchen jeweils 6 ml LB-Medium und die entsprechende Konzentration des Antibiotikums zugegeben. Das Antibiotikum diente dem spezifischen Wachstum der Bakterien, die das Plasmid enthielten. Das Animpfen der Bakterien erfolgte mit sterilen Holzstäbchen. Die Bakterien wurden anschließend über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler kultiviert.

#### Isolierung der Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des Qiagen Miniprep Kit, der kommerziell bei der Firma Qiagen erhältlich ist, sowie dem dazugehörigen Protokoll (<http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/literature.aspx?id=1000248>, Stand April 2008). Dieser Kit basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen gefolgt von einer Adsorption der DNA an eine Silicatmembran unter Hochsalzbedingungen.

Das Röhrchen mit der jeweiligen Bakterienkultur wurde für 10 min bei 2800 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 250 µl Puffer P1 (enthält RNase) resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. 250 µl Puffer P2 (enthält Lysozym) wurde zugegeben und das Eppendorf-Gefäß 4-6 mal geschüttelt bis sich die Flüssigkeit aufklärte. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, durfte diese Lysisreaktion nicht länger als 5 min stattfinden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 350 µl Puffer N3, gefolgt von erneutem 4-6 maligem Schütteln bis die Lösung flockig wurde. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13000 U/min in einer Mikrozentrifuge, wurde der Überstand in ein QIAprep Spin Column (Eppendorf-Gefäß mit Säule) pipettiert und für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Folgend wurde ein optionaler Waschschrift mit 500 µl Puffer PB und erneuter Zentrifugation für 1 min bei 13000 U/min und ein sich anschließender Waschschrift mit 750 µl Puffer PE und gleichen Zentrifugationsbedingungen durchgeführt. Ein zusätzlicher Waschschrift von 1 min bei 13000 U/min in der Zentrifuge entfernte den restlichen Waschpuffer. Anschließend wurde das QIAprep Spin Column in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß gestellt. Zur Eluierung der DNA wurde 50 µl *Aqua ad iniectionem* zur Säule gegeben und erneut für 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Die isolierte Plasmid-DNA konnte dauerhaft bei -20°C gelagert werden.

### 2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion) (Saiki *et al.*, 1986) ermöglicht die exponentielle *in vitro* Amplifizierung von DNA-Sequenzen. Sie setzt sich aus mehreren, nacheinandergeschalteten Zyklen zusammen. Ein PCR-Zyklus besteht aus 3 Schritten:

1. **Denaturierung:** Trennung der doppelsträngigen DNA-Matrize in Einzelstränge bei Temperaturen von 92-95°C
2. **Annealing:** Anlagerung der Primer an komplementäre Sequenzen innerhalb des DNA-Einzelstranges bei 37-70°C
3. **Elongation:** Verlängerung beider Primer in 5'→3' Richtung durch die *Taq*-Polymerase, ein hitzestabiles Enzym aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, dessen Aktivitätsoptimum bei 72°C liegt (Saiki *et al.*, 1988)

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurden unter einer Werkbank durchgeführt, die vorher durch UV-Licht sterilisiert wurde. Alle verwendeten Lösungen wurden mit *Aqua ad iniectionem* hergestellt. Die Lösungen durften keine Fremd-DNA enthalten, da diese bei der PCR amplifiziert worden wären und die Ergebnisse als Hintergrund hätten stören können.

#### 2.3.2.1 DOP-PCR

Bei einer speziellen Form der PCR, der DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide primed* PCR, PCR mit degenerierten Oligonukleotidprimern) (Telenius *et al.* 1992), liegt ein Primergemisch vor, bei dem unspezifische Primersequenzen von GC-



reichen Sequenzen flankiert werden. Zusammen mit der niedrigen Annealingtemperatur in den ersten Zyklen der DOP-PCR, können die Primer an vielen Stellen der humanen Sequenzen der DNA binden.

Die DOP-PCR wurde zur Amplifizierung der aus den *E. coli* Bakterien isolierten BAC-DNA bzw. der durch Mikrosezierung gesammelten DNA verwendet.

Der degenerierte Oligonukleotidprimer wurde von Herrn Dr. E. Birch-Hirschfeld (Institut für Virologie, FSU Jena) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die DOP-Primersequenz lautet: 5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'.

Pro Reaktionsansatz wurden 3,37 µl DNA eingesetzt. Die verwendeten Lösungen für die DOP-PCR sind in Tab. 2 zusammengefasst.

**Tab. 2: Übersicht der für die DOP-PCR verwendeten Lösungen, deren Konzentrationen sowie die einzusetzenden Mengen pro DNA-Sonde.**

	Stocklösung	Endkonzentration	Einzelansatz [µl]
<b>Lösung A</b>			
Sequenase-Puffer	5×	0,6×	0,6
DOP-Primer	40,0 µM	5,0 µM	0,63
dNTPs	je 2,5 mM	200 µM	0,4
<b>Lösung B</b>			
Sequenase	13 U/µl	1,6 U/µl	0,4
Sequenase-Dilution			2,8
Buffer			
<b>Lösung C</b>			
<i>Aqua ad iniectabilia</i>			34,23
Stoffel-Fragment	10,0×	1,0×	5
Puffer			
dNTPs	je 2,5 mM	220 µM	4,4
DOP-Primer	40,0 µM	1,1 µM	1,37
MgCl <sub>2</sub>	25,0 mM	2,5 µM	5
<b>Lösung D</b>			
<i>Aqua ad iniectabilia</i>			3,5
Stoffel-Fragment	1×	1,25 µl	0,5
Puffer			
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,50 mM	0,5
Stoffel Taq-Polymerase	1 U/µl	1,25 µl	0,5

Die DOP-PCR wurde unter einer sterilen Werkbank im Thermocycler PTC-200 (MJ Research) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- |    |      |        |  |
|----|------|--------|--|
| 1. | 92°C | 5'     | erster Denaturierungsschritt   |
| 2. | 25°C | 2'20'' | Zugabe von 0,25 µl Lösung B,<br>Annealing der Primer an die Ziel-DNA erfolgt |
| 3. | 34°C | 2'     | Elongation   |
| 4. | 90°C | 1'     | Denaturierung  |

Die Schritte 2-4 wurden 3 mal bei Plasmid-DNA bzw. 8 mal bei DNA nach Mikrosequenzierung durchgeführt. Anschließend erfolgte die spezifische Amplifizierung bei höheren Temperaturen wie folgt:

- |     |      |        |   |
|-----|------|--------|---|
| 5.  | 30°C | 2'20'' | Zugabe von 45 µl Lösung C   |
| 6.  | 92°C | 1'     | Denaturierung   |
| 7.  | 56°C | 2'20'' | Zugabe von 5 µl Lösung D, Annealing (Anlagerung der Primer an die in den ersten 3 bzw. 8 Zyklen gebildeten DNA-Stränge) |
| 8.  | 70°C | 2'     | Elongation  |
| 9.  | 92°C | 1'     | Denaturierung   |
| 10. | 56°C | 1'     | Annealing   |
| 11. | 72°C | 2'     | Elongation  |

Die Schritte 9-11 wurden 32 mal durchgeführt.

- |     |      |                |                                       |
|-----|------|----------------|---------------------------------------|
| 12. | 72°C | 10'            | Elongation                            |
| 13. | 4°C  | <i>forever</i> | bis zur Probenentnahme aus dem Cycler |

Nach der DOP-PCR wurde pro Ansatz 1 µl EDTA zugegeben. Dies gewährleistete eine höhere Stabilität der DNA gegenüber Nukleasen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

### 2.3.2.2 Reamplifizierungs-PCR

Die DNA nach der DOP-PCR wurde über eine weitere PCR erneut amplifiziert. Es wurden die gleichen Lösungen wie für die DOP-PCR verwendet. Der PCR-Ansatz ist in Tab. 3 zusammengefasst.

**Tab. 3: Übersicht der für die Reamplifizierungs-PCR verwendeten Lösungen, deren Konzentrationen sowie die einzusetzenden Mengen pro DNA-Sonde.**

	Stocklösung	Endkonzentration	Einzelansatz [µl]
<i>Aqua ad iniectabilia</i>			34,25
Stoffel-Fragment Puffer	10×	1×	5
DOP-Primer	40 µM	2 µM	1,25
dNTP's	2,5 mM	0,2 mM	4
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	5
Stoffel <i>Taq</i> -Polymerase	10 U/µl	0,1 U/µl	0,5

Pro Ansatz wurde 1 µl DNA pipettiert und gut vermischt. Anschließend wurde das PCR-Programm im Thermocycler wie folgt durchgeführt:

1. 92°C 3' Initiale Denaturierung
2. 91°C 1' Denaturierung
3. 56°C 1' Annealing
4. 70°C 2' Extension
5. 74°C 0,1°C/s

Die Schritte 2-5 wurden 30 mal durchgeführt.

6. 72°C 5' Analyse der Schmelzkurve der Proben
7. 4°C *forever* bis zur Probenentnahme aus dem Cycler

Nach der PCR wurde pro Ansatz 1 µl EDTA pipettiert. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

### 2.3.2.3 Markierungs-PCR

Die DNA wurde über eine PCR markiert. Die Markierung erfolgte direkt mit Fluorochromen oder indirekt mit Haptenen. Es wurde ein dNTP „label-mix“ hergestellt, der jeweils 2 mM dATP, dCTP, dGTP enthält und 1 mM dTTP. dTTP wurde in einer niedrigeren Konzentration zugegeben, da anstelle von dTTP während der PCR das markierte Basenanaloga dUTP eingebaut wurde. In Tab. 4 ist der Ansatz für die Markierungs-PCR zusammengefasst.

**Tab. 4: Übersicht der für die Markierungs-PCR verwendeten Lösungen, deren Konzentrationen sowie die einzusetzenden Mengen pro DNA-Sonde.**

	Stocklösung	Endkonzentration	Einzelansatz [µl]
<i>Aqua ad iniectabilia</i>			12,08
RB 10× Puffer	10,0×	1,0×	2
DOP-Primer	40 µM	2 µM	1
dNTP label-mix			2
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	2
Biotin-16-dUTP	1 mM	45 µM	1
AmpliTag Polymerase	5 U/µl	0,03 U/µl	0,12

Pro Ansatz wurden 2 µl DNA pipettiert und gut vermischt. Der Ablauf der PCR im Thermocycler erfolgte nach dem Protokoll der Reamplifizierungs-PCR (siehe 2.3.2.2). Danach wurde die DNA, wie unter 2.3.4 beschrieben, gefällt und bei -20°C gelagert.

#### 2.3.2.4 Alternative DNA-Markierung mit Nick-Translation

Eine schnellere Markierung der DNA, als über eine DOP-PCR, ist mit Nick-Translation möglich. Dabei kann die isolierte DNA ohne eine vorangegangene Amplifikation sofort eingesetzt werden.

Bei der Nick-Translation (Rigby *et al.*, 1977) werden markierte desoxy-Uridin-Triphosphate (dUTPs) in die DNA eingebaut. Dies geschieht unter Mithilfe verschiedener Enzyme: Die Endonuklease DNase I aus dem Pankreas erzeugt bei sehr niedriger Enzymkonzentration in Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup> an statistisch verteilten Stellen des DNA-Doppelstranges Einzelstrangsnitte („nicks“). Die DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli* nutzt die freien 3'-OH-Enden dieser Schnitte als Primer für die 5'→3' DNA-Synthese, komplementär zum intakten Strang. Die 5'→3' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase I entfernt dabei gleichzeitig die Nukleotide in Syntheserichtung und ersetzt sie durch neue dNTPs. Auf diese Weise wird die Bruchstelle langsam in 5'→3' Richtung auf der DNA verschoben („transloziert“). Das molare Verhältnis von dUTP zu dTTP bewirkt, dass alle 20-25 Nukleotide in der neu synthetisierten DNA ein markiertes Nukleotid eingebaut wird. Eine Denaturierung der DNA vor der Nick-Translation ist nicht erforderlich.

Die DNA wurde direkt oder indirekt markiert. Die indirekte Markierung erfolgte mit Haptenen, die gekoppelt an dUTPs in die DNA eingebaut werden. Es wurde 1 µg der DNA eingesetzt und in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Zu der DNA wurden 4 µl Nick-Translationsmix (Biotin- oder Digoxigeninmarkierung, Roche) pipettiert und auf 20 µl Endvolumen mit *Aqua ad iniectabilia* aufgefüllt. Nach dem Vortexen erfolgte die Inkubation für 90 min bei 15°C im Thermocycler. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 µl 0,5 M EDTA in das Eppendorf-Gefäß gegeben und das Gemisch 10 min bei 65°C inkubiert.

Die direkte Markierung erfolgte ähnlich. Es wurden ebenfalls 1 µg DNA und 4 µl Nick-Translationsmix (Roche) verwendet. Zusätzlich wurden 4 µl eines 5-fach konzentrierten Nukleotidmixes benötigt, dessen Zusammensetzung in Tab. 5 beschrieben ist. Das Endvolumen wurde mit *Aqua ad iniectionabilia* auf 20 µl aufgefüllt. Die weiteren Schritte erfolgten analog der indirekten Markierung.

**Tab. 5: Zusammensetzung des Nukleotidmixes für die direkte Markierung.**

Lösung	Verdünnung; Konzentration	Volumen
dATP	1:40; 2,5 mM	5 µl
dCTP	1:40; 2,5 mM	5 µl
dGTP	1:40; 2,5 mM	5 µl
dTTP	1:40; 2,5 mM	3,4 µl
Fluorophor-dUTP	unverdünnt; 1 mM	4 µl
<i>Aqua ad iniectionabilia</i>		27,6 µl

Anschließend wurde die DNA, wie unter 2.3.4 beschrieben, gefällt, in 20 µl Dextransulfat gelöst und bei -20°C gelagert.

#### 2.3.2.5 Mikrosatelliten-PCR

Mikrosatelliten sind tandemartige Wiederholungen einer Sequenz, die kleiner als 10 bp und über das gesamte menschliche Genom verstreut ist. Da das Muster der Anzahl an Wiederholungen spezifisch für jedes Individuum ist, können sie zur Bestimmung der parentalen Herkunft von Chromosomen oder Chromosomenregionen verwendet werden.

Die Mikrosatelliten-PCR wurde nach der DOP-PCR der DNA der gesammelten Zellkerne durchgeführt (siehe 2.4.2). Der Einzelansatz für jede Probe ist in Tab. 6 zusammengefasst.

**Tab. 6: Zusammenfassung der verwendeten Lösungen für die Mikrosatelliten-PCR.**

	Stocklösung	Endkonzentration	Einzelansatz [µl]
<i>Aqua ad iniectionabilia</i>			7,28
RB 10× Puffer	10 x	1,06 x	1,25
Primer-Mix			0,75
dNTPs	2,5 mM	0,1 mM	0,5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3,4 mM	1,6
AmpliTaQ Polymerase	10 U/µl	0,1 U/µl	0,12

Die verwendeten Primer sind in Tab. 41 im Anhang aufgelistet. Pro Ansatz wurde 1 µl DNA, die vorher auf eine Konzentration von 50 ng/µl verdünnt oder konzentriert

wurde, zugegeben. Der Einzelansatz inklusive der DNA wurde in Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend wurde das PCR-Programm im Thermocycler wie folgt durchgeführt:

- |    |      |      |                        |
|----|------|------|------------------------|
| 1. | 95°C | 3'   | Initiale Denaturierung |
| 2. | 95°C | 45'' | Denaturierung          |
| 3. | 62°C | 30'' | Annealing              |
| 4. | 72°C | 45'' | Extension              |

Die Schritte 2-4 wurden 30 mal durchgeführt.

6. 4°C *forever* bis zur Probenentnahme aus dem Cycler

### 2.3.2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nach der Mikrosatelliten-PCR wurden die Proben auf einem 6%igen PAA-Gel (Polyacrylamid-Gel) aufgetrennt.

#### Verwendete Reagenzien für die Gelelektrophorese

10x TBE Puffer, pH 8,0  
162 g Tris-base (1340 mM)  
27,5 g Borsäure (45mM)  
9,3 g EDTA (25mM)  
auf 1 l mit *Aqua dest.* auffüllen

Silanlösung  
125 µl Silanstocklösung  
25 ml Ethanol (100 %)

PAA-Gel, 6 %ig  
30 ml Sequa Gel XR  
7,5 ml Sequa Gel complete (Puffer)  
300 µl 10 %iges APS (Ammoniumpersulfat)

Loading-Mix  
4,75 ml Formamid  
200 µl EDTA (0,5 M)  
25 µl 10 %iges Bromphenolblau  
25 µl 10 %iges Xylencyanat

#### Ablauf der Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgte in einem Li-cor 4000 Gerät. Dies ist eine vertikale Elektrophoreseapparatur. Die Visualisierung der DNA-Fragmente im Gel erfolgte

durch Markierung der DNA mit einem Infrarotfarbstoff und Messung der Emission während der Elektrophorese.

Die Glasplatten wurden vor der Verwendung zur Entfernung aller Polyacrylamidgelreste mit Ethanol gereinigt und im Kammbereich silanisiert. Dazu wurde 165 µl Silanlösung mit 5 µl Essigsäure gemischt und auf die Glasplatten verrieben. Anschließend wurde das PAA-Gel hergestellt und luftblasenfrei gegossen. Das Gel polymerisierte mindestens 30 min aus. Danach erfolgte der Einbau der Glasplatten in das Gerät und die Zugabe von 1xTBE als Laufpuffer. Es wurden 2 µl Probe mit 2 µl Loading-Mix gemischt, die DNA anschließend 3 min bei 80°C denaturiert und ca. 2 µl auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurde der 50-350 bp Sizing Standard, markiert mit dem Fluoreszenzfarbstoff IRDye der Firma Li-cor verwendet. Die Elektrophorese lief 2 h bei 774 V und 24,9 W.

### 2.3.2.7 Gradienten-PCR

Die für die Gradienten-PCR verwendeten Primer wurden über das Programm Primer 3 ([http://biotoools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotoools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi), Stand April 2008) ermittelt und bei der Firma biomers.net synthetisiert. Sie sind zusammengefasst in Tab. 41 im Anhang beschrieben. Die Annealingtemperatur der Primer wurde über eine Gradienten-PCR optimiert. Tab. 7 zeigt den Reaktionsansatz der PCR pro Primerpaar, Hin-Primer (Primer *Forward*) und Rück-Primer (Primer *Revers*) für beide DNA-Stränge.

**Tab. 7: Übersicht der für die Gradienten-PCR verwendeten Lösungen, deren Konzentrationen sowie die einzusetzenden Mengen pro DNA-Sonde.**

	Stocklösung	Endkonzentration	Einzelansatz [µl]
<i>Aqua ad iniectabilia</i>			10,8
RB 10× Puffer	10×	1×	2
Primer Forward	20 µM	1 µM	1
Primer Revers	20 µM	1 µM	1
dNTP's	2,5 mM	0,2 mM	2
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,5 mM	2
AmpliTaQ Polymerase	10 U/µl	0,1 U/µl	0,2

Es wurde pro Reaktionsansatz 1 µl DNA zugegeben. Die Ansätze wurden in 96 Well-Platten pipettiert und im Thermocycler PTC-200 nach dem gleichen Protokoll wie die Reamplifizierungs-PCR (siehe 2.3.2.3) durchgeführt. Die Annealingtemperaturen variierten zwischen 55°C und 65°C. Anschließend wurde das PCR-Ergebnis über eine Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.2.8) kontrolliert.

### 2.3.2.8 Agarosegelelektrophorese

Die über die Gradienten-PCR amplifizierten Proben wurden auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Verwendete Reagenzien für die Gelelektrophorese

10x TBE Puffer, pH 8,0  
 162 g Tris-base (1340 mM)  
 27,5 g Borsäure (45mM)  
 9,3 g EDTA (25mM)  
 auf 1 l mit *Aqua dest.* auffüllen

Agarosegel, 1 %ig  
 1 g Agarose  
 50 ml 1x TBE Puffer

Ablauf der Gelelektrophorese

Die 1 %ige Agaroselösung wurde für ca. 2 min in der Mikrowelle gekocht bis sich die Agarose gelöst hatte. Dann wurde die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt und 7,5 µl SYBR Green dazugegeben. SYBR Green ist ein Farbstoff, der an die DNA bindet und unter UV-Licht fluoresziert. Diese Gellösung wurde in eine vorbereitete Gelkammer mit einem Kamm gefüllt. Als das Gel nach ca. 30 min fest geworden war, wurde der Kamm entfernt und das Gel ohne die Kammer in 1x TBE Laufpuffer gelegt. Anschließend erfolgte das Auftragen der Proben in die Kammern des Gels. Pro Ansatz wurden 2 µl DNA und 2 µl SYBR Green pipettiert. Als Längenstandard wurde der 100 bp DNA Ladder der Firma Invitrogen verwendet. Die Elektrophorese lief ca. 20 min bei 80 V. Die anschließende Auswertung erfolgte unter UV-Licht.

## 2.3.2.9 RealTime-PCR

Die RealTime-PCR ermöglicht die Quantifizierung der DNA am Ende bzw. auch während des PCR-Zyklusses, also in Echtzeit. Die Messung erfolgt anhand von Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit der Produktmenge generiert wird. Für die PCR wurde der QuantiTect SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen verwendet, der bereits alle notwendigen Komponenten der PCR (DNA-Polymerase, Puffer, dNTPs, SYBR Green und MgCl<sub>2</sub>) enthält. Die Mengen der eingesetzten Lösungen pro PCR-Ansatz sind in Tab. 8 zusammengefasst. Die verwendeten Primer sind in Tab. 42 im Anhang aufgeführt und wurden vorher über eine Gradienten-PCR (siehe 2.3.2.8) hinsichtlich ihrer optimalen Annealingtemperatur getestet.

**Tab. 8: Übersicht der für die RealTime-PCR verwendeten Lösungen, deren Konzentrationen sowie die einzusetzenden Mengen pro DNA-Sonde.**

	Stocklösung	Endkonzentration	Einzelansatz [µl]
<i>Aqua ad iniectabilia</i>			2,5
PCR Kit			5
Primer Forward	20 µM	1 µM	1
Primer Revers	20 µM	1 µM	1



Das Ansatzvolumen betrug jeweils 9,5 µl, wurde in Glaskapillaren pipettiert und 0,5 µl DNA zugegeben. Nach einer sich anschließenden Zentrifugation für 1 min bei 2000 U/min wurden die Glaskapillaren in den Light Cycler der Firma Roche transferiert und die RealTime-PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- |    |      |     |                                |
|----|------|-----|--------------------------------|
| 1. | 95°C | 15' | Aktivierung der DNA-Polymerase |
| 2. | 91°C | 1'  | Denaturierung                  |
| 3. | 62°C | 1'  | Annealing                      |
| 4. | 70°C | 2'  | Extension                      |

Die Schritte 2-4 wurden 20 mal durchgeführt.

- |    |      |                |                                       |
|----|------|----------------|---------------------------------------|
| 6. | 72°C | 5'             |                                       |
| 7. | 4°C  | <i>forever</i> | bis zur Probenentnahme aus dem Cycler |

Anschließend wurden die amplifizierten DNA-Proben auf einem Agarosegel aufgetrennt (siehe 2.3.2.8) und anhand ihrer Größe kontrolliert.

### 2.3.3 DNA-Fällung

Die markierte DNA aus 2.3.2.3 oder 2.3.3 wurde durch eine Ethanol-fällung gereinigt und aufkonzentriert.

#### Verwendete Reagenzien

tRNA aus *E.coli* (Boehringer)  
Stocklösung 10 µg/µl

Natriumacetat 3 M, pH 5,2  
24,6 g Natriumacetat (wasserfrei, Sigma)  
add 100 ml *Aqua dest.*  
pH 5,2 mit Eisessig (Merck) einstellen

Dextransulfat  
2 g Dextransulfat Pulver (Sigma)  
2 ml 20× SSC (Gibco)  
2 ml 0,5 M Natriumphosphat (Merck)  
add 10 ml *Aqua dest.*, ca. 2 h bei 70°C lösen  
Verbrauchslösung 1:1 mit deionisiertem Formamid (ICN Biomedicals) verdünnen

#### Ablauf

Pro DNA-Sonde wurden 5 µl Natriumacetat, 10 µl tRNA (erhöht den Anteil der zu fällenden Nukleinsäuren) und das 2,5 fache des Volumens an 100 % Ethanol zugegeben. Anschließend erfolgte die Fällung für 20 min bei -80°C bzw. mindestens 1 h bei -20°C. Bei 4°C, 1500 U/min und 15 min wurde die Probe anschließend

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 10 min in der Speed vac (Sevant) unter Vakuum getrocknet und in 20-50 µl Dextransulfat resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### 2.3.4 SNP-Arrays

Die Untersuchungen mit SNP-Arrays wurden freundlicherweise von Frau Diplom-Biologin Nicole Porsorski, Abteilung Tumorzytogenetik des Instituts für Humangenetik und Anthropologie, Jena durchgeführt. Dazu wurde der 500 K SNP-Array der Firma Affymetrix (Santa Clara, USA) verwendet. Dieser besteht aus zwei Arrays, die jeweils ca. 250000 SNPs auf ihrer Oberfläche tragen. Die Durchführung erfolgte nach Standardprotokoll der Firma Affymetrix (<http://www.affymetrix.com/products/arrays/-specific/500k.affx>, Stand April 2008). Die für den Array verwendete genomische DNA wurde aus Lymphozytensuspension oder Vollblut mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) isoliert. Dazu wurden je 200 µl Suspension bzw. Blut eingesetzt und mit 20 µl Proteinase K (Qiagen) gemischt. Anschließend wurden 200 µl Puffer AL hinzugefügt, die Lösung für 15 s gevortext und 10 min bei 56°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte eine Zugabe von 200 µl 100 %igem Ethanol, erneutem Vortexen für 15 s sowie Transfer der Lösung in ein QIAamp Mini Spin Column (Eppendorf-Gefäß mit Säule). Danach wurde die Lösung für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Es folgten ein Waschschriff mit 500 µl Puffer AW1 und Zentrifugation für 1 min bei 8000 U/min sowie ein Waschschriff mit 500 µl Puffer AW2 und Zentrifugation für 3 min bei 14000 U/min. Anschließend wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und zur Eluierung der DNA 200 µl Puffer AE dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 min bei RT folgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei 8000 U/min. Die isolierte gesamtgenomische DNA konnte dauerhaft bei -20°C gelagert werden.

### 2.4 Mikrosezierung

#### 2.4.1 Mikrosezierung von Chromosomen

Die Mikrosezierung (Rubtsov *et al.*, 1996) ermöglicht das Herausschneiden ganzer Chromosomen oder Teilstücke von Chromosomen mit Hilfe von Glasnadeln unter einem Mikroskop.

##### 2.4.1.1 Vorbereitung der Mikrosezierung

###### Herstellung der Glasnadeln

Die Glasnadeln wurden aus Schott Duranglasstäben (ø 2 mm) mit einem Pipettenziehgerät (Narishige, Modell PB-7) hergestellt. Dazu wurden ca. 10 cm lange Stäbe verwendet. In Stufe 1 wurde der Glasstab mit maximaler Heizkraft dünn ausgezogen. In Stufe 2 wurde mit geringer Wärme und einem Gewicht der Stab in 2 Teile gezogen. Vor Gebrauch wurden die Nadeln mindestens 1 Stunde mit UV-Licht bestrahlt und so sterilisiert.

### Herstellung der Sammelpipetten

Zum Sammeln der Chromosomen wurden Pasteurpipetten aus Glas (225 mm, Brand) verwendet. Das Ausziehen der Pipetten erfolgte am gleichen Gerät, welches auch für die Glasnadeln verwendet wurde. Mit 80 %iger Heizkraft wurde die Pipette in Stufe 1 ausgezogen. In Stufe 2 wurde die Pipette bei mittlerer Kraft endgültig abgerissen. Die vordere Spitze wurde im Bereich der Heizwendel vorsichtig abgebrochen. Anschließend wurden die Pipetten silikonisiert. Dazu wurde eine 1 %ige Dichlormethylsilanlösung in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß hergestellt. Die Pipettenspitze wurde kurz in das Eppendorf Gefäß getaucht und danach mit 1 mM NaEDTA neutralisiert. Anschließend wurden die Pipetten getrocknet (60°C 1 h - 100°C 30 min - 60°C 1 h).

### Vorbereitung der Deckgläser

Für das Spreiten der Metaphasen wurden gut gereinigte Deckgläser (24 x 60 mm) benötigt. Sie wurden vor Gebrauch mehrere Tage in 10 %iger SDS-Lösung (Sigma) entfettet. Mindestens 1 h vor Gebrauch wurden die Deckgläser mehrmals mit *Aqua dest.* gespült und anschließend in einer Küvette mit *Aqua dest.* bei 4°C aufbewahrt.

### Herstellung und Färbung der Chromosomenpräparate

Auf die feuchten Deckgläser wurde die Zellsuspension (abhängig von deren Dichte ca. 1-2 Tropfen) und Fixativ aufgetropft und anschließend luftgetrocknet. Die Färbung erfolgte unter sterilen Bedingungen mit Giemsa. Dazu wurden die Deckgläser für 1 min in Phosphatpufferlösung gelegt, anschließend 40-60 s in einer Trypsin-Gebrauchslösung kontrolliert verdaut und 2-3 min in vorbereiteter Giemsafarblösung gefärbt. Abschließend wurden die Deckgläser kurz in *Aqua dest.* gespült und luftgetrocknet.

### Herstellung der Sammellösung

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch steril gefiltert und mindestens 2 h mit UV-Licht bestrahlt werden (außer Proteinase K). Die Sammellösung wurde unter einer sterilen Werkbank angesetzt. Dazu wurde in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß 3,3 µl Glycerol, 1 µl Proteinase K (15 mg/ml) und 5,7 µl Salzlösung (siehe Tab. 9) pipettiert.

Tab. 9: Zusammensetzung der Salzlösung.

Lösung	Konzentration	Volumen [ $\mu$ l]
Natriumchlorid	100 mM	20
TrisHCl	100 mM	20
NaEDTA	10 mM	20
Triton	1%	20
SDS	1%	20
<i>Aqua ad iniectabilia</i>		14

Vor Beginn der Mikrosezierung wurde die Pipettenspitze in das Eppendorf Gefäß mit der Salzlösung getaucht. In der Spitze der Pipette sollte der Flüssigkeitstropfen gut erkennbar sein. Dann wurde die Pipette bis zur Verwendung in eine feuchte Kammer gelegt.

#### 2.4.1.2 Die Durchführung der Mikrosezierung

Die Durchführung der Mikrosezierung erfolgte an einem Inversmikroskop (Axiovert-10 oder Axiovert-135, Zeiss). Als Nadelhalter für die sterile Glasnadel diente ein Druckbleistift, der auf der rechten Seite des Mikroskops in eine Halterung, die mit einem Mikromanipulator verbunden ist, platziert und mit einem 10er Objektiv zentriert wurde. Mit einem 100er Objektiv wurde eine Metaphase auf dem Deckglas gesucht und in die Bildfeldmitte eingestellt. Durch einen drehbaren Objekttisch konnte das zu schneidende Chromosom in die gewünschte Lage in Bezug zur Glasnadel gebracht werden. Mit einem Joystick wurde die Glasnadel manuell abgesenkt, bis sie vor dem gewünschten Chromosom auf dem Deckglas aufsetzte. Durch eine weitere Absenkung der Glasnadel entstand eine Vorwärtsbewegung, und das gewünschte Chromosom konnte mit der Nadel aufgesammelt werden. Die, mit dem Chromosom beladene Glasnadel, wurde mit dem Joystick nach oben bewegt. Dann wurde die Sammelpipette in die linke Halterung am Mikroskop eingespannt. Anschließend wurde die Nadelspitze in die Pipettenspitze eingeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Chromosom in dem Sammeltropfen zurückbleibt. Dieser gesamte Vorgang wurde wiederholt, bis ca. 5-10 Fragmente gesammelt waren. Anschließend erfolgte ein Proteinverdau mit der, in der Sammelösung enthaltenen, Proteinase K durch eine Inkubation der Pipette für 2 h bei 60°C im Wasserbad. Die Proteinase K spaltete die Proteine und gewährleistete somit eine effektivere Amplifizierung der DNA mittels PCR. Nach dem Proteinverdau wurde der Sammeltropfen in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, in dem sich die erste Lösung für die DOP-PCR befand (siehe 2.3.2.1). Der Inhalt der Pipette wurde ausgeblasen. Es schloss sich eine DOP-PCR an.

## 2.4.2 Mikrosezierung von Zellkernen

(nach Chudoba *et al.*, 1997, Heller *et al.*, 2000)

### 2.4.2.1 Vorbereitung der Mikrosezierung

Die Herstellung der Glasnadeln und das Vorbereiten der Deckgläser erfolgten analog zur Mikrosezierung von Chromosomen (siehe 2.4.1). Da die Chromosomenmorphologie beim Sammeln von Kernen keine Bedeutung hat, wurden die Präparate nicht mit Trypsin behandelt. Die, nach dem Auftropfen der Zellsuspension, luftgetrockneten Präparate wurden 3 min in der Giemsa-Färbelösung inkubiert und anschließend mit *Aqua dest.* gespült. Die Unterseite des Deckglases wurde getrocknet, während die Oberseite feucht blieb und gegebenenfalls auch während der Mikrosezierung mit *Aqua dest.* befeuchtet werden musste. Unterschiede zur Mikrosezierung von Chromosomen gab es ebenfalls in der Aufnahme der DNA in die Sammelösung. Bei der Mikrosezierung von Kernen wurde die DNA durch Abbrechen der Glasnadel in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß gesammelt. Somit wurde keine Sammelpipette benötigt. Die Sammelösung enthielt eine andere Zusammensetzung. Sie wurde unter einer sterilen Werkbank hergestellt und setzte sich aus 55 % *Aqua dest.*, 15 % Sequenase Puffer (Konzentration 0,75x) und 30 % Proteinase K (Konzentration 15 mg/ml) zusammen. Davon wurden 4 µl in das Eppendorf-Gefäß pipettiert.

### 2.4.2.2 Durchführung der Mikrosezierung

Die Mikrosezierung von Kernen erfolgte analog der Mikrosezierung von Chromosomen. Mit Hilfe der Glasnadel und des Joysticks konnten 2-4 Kerne mit nur einer Nadel gleichzeitig gesammelt werden. Anschließend wurde die Nadel manuell nach oben bewegt und im Mikroskop kontrolliert, ob sich die Kerne noch an der Spitze der Nadel befanden. Dann wurde die Nadel in das Eppendorf Gefäß, welches die Sammelösung enthielt, geführt und an dessen Boden die Spitze abgebrochen. Beim Einführen war es wichtig darauf zu achten, dass die Nadel nicht die Wand des Gefäßes berührte. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis ca. 20 Kerne gesammelt waren. Anschließend erfolgte der Proteinverdau. Dazu wurde das Eppendorf Gefäß in einen Thermocycler gestellt und die DNA für 2 h bei 60°C inkubiert. Nach dem Proteinverdau schloss sich eine DOP-PCR (siehe 2.3.2.1) an.

## 2.4.3 FISH-Mikrosezierung

(nach Weimer *et al.*, 2000)

Die FISH-Mikrosezierung ist eine Methode, welche die Techniken der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und der Mikrosezierung kombiniert. Dabei wird die Mikrosezierung an Chromosomen oder Zellkernen durchgeführt, die vorher durch FISH Sonden visualisiert werden.

Einen Tag vor der Mikrosezierung wurden Deckgläser mit Suspension vorbereitet (siehe 2.4.1) und über Nacht eine FISH mit den gewünschten DNA Sonden durchgeführt (siehe 2.5). Nach dem Waschschrift zur Entfernung ungebundener Sonden am nächsten Tag, konnte mit der Mikrosezierung begonnen werden. Die Mikrosezierung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop. Mit den Fluoreszenzfiltern war es möglich, die DNA Sonden, gebunden an eine Ziel-DNA, zu visualisieren. Das Schneiden der Chromosomen bzw. Sammeln der Kerne erfolgte anschließend unter dem Phasenkontrast am gleichen Mikroskop. Nach der Mikrosezierung folgten der Proteinverdau und die DOP-PCR (siehe 2.4.2.2 bzw. 2.3.2.1).

## 2.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Das Protokoll für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde teilweise übernommen bzw. verändert nach Rautenstrauss und Liehr; 2002.

### 2.5.1 Verwendete Reagenzien

#### Cot DNA lyophilisiert

10 bzw. 25 µl Cot Human DNA (1 mg/ml, Roche) mit jeweils doppeltem Volumen 100 % EtOH ansetzen, in der Speed vac (Savant) eintrocknen, Lagerung bei -20°C

#### DAPI/Antifade

0,4 % 4',6'-Diamino-2-Phenylindol (DAPI, Sigma) 1:3000 bis 1:5000 mit Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories) verdünnen, Lagerung lichtgeschützt bei 4°C

#### deionisiertes Formamid

2 g Resin-Kügelchen (Bio Rad) Ionenaustauscher  
50 ml 100 % Formamid  
für 3 h schütteln, filtrieren und bei -20°C lagern

#### Dextransulfat

2 g Dextransulfat Pulver (Sigma)  
2 ml 20× SSC (Gibco)  
2 ml 0,5 M Natriumphosphat (Merck)  
add 10 ml *Aqua dest.*, ca. 2 h bei 70°C lösen

Verbrauchslösung 1:1 mit deionisiertem Formamid (ICN Biomedicals) verdünnen

#### Formamid 70

70 % Formamid (Merck)  
2× SSC  
in *Aqua dest.*  
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

**Natriumphosphat 0,5 M**

0,5 M  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$  und 0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1:1 mischen  
pH 7,0 einstellen

**1× PBS (phosphate buffered saline)**

PBS Dulbecco (9,55 g/l, Seromed)  
in *Aqua dest.*

**Pepsin-Lösung**

1,0 % 1 N HCl  
0,5 % Pepsin-Stammlösung (1 g Pepsin auf 50 ml *Aqua dest.*, Sigma)  
in *Aqua dest.*

**Postfixationslösung**

50 % Paraformaldehydlösung (1 % Formaldehyd in 1× PBS)  
5 % 1 M  $\text{MgCl}_2$   
in 1× PBS ansetzen

**1× SSC**

in *Aqua dest.*  
pH 7,0 mit 1N HCl einstellen

**20× SSC**

87,65 g Natriumchlorid (Roth)  
44,10 g Natriumcitrat-Dihydrat (Merck)  
add 500 ml *Aqua dest.*, autoklavieren  
bzw. als gebrauchsfertige Lösung erhältlich bei Gibco BRL

**4× SSCT**

4× SSC  
0,05 % Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat, Sigma)  
in *Aqua dest.*  
pH 7,0 mit 1 N HCl einstellen

**SSCTM**

0,1 g fettfreie Trockenmilch (Marvel)  
2 ml 4× SSCT  
vortexen, 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren, obere Schicht verwerfen

**2.5.2 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate**

Da die Chromosomen noch von einem Zytoplasmasaum umgeben sein können, erfolgte eine Vorbehandlung der Objektträger mit Pepsin. Dies führte zu einer Zersetzung des Zytoplasmas in deren Folge die Diffusion der Sonden zu den Chromosomen erleichtert und bei der Detektion die vorhandene Eigenfluoreszenz

minimiert wurde. Das Ziel dieses Vorgehens war, eine verbesserte Signalstärke zu gewährleisten.

Die OT wurden für 5 min in einer Küvette mit einer 1 %igen HCl Lösung bei 37°C inkubiert. Kurz vor der Behandlung wurde die Pepsinstammlösung (20mg/ml) zugegeben. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch einen Waschschrift für 5 min in 1x PBS bei RT. Anschließend wurden die Chromosomen für 10 min bei RT mit einer 1 %igen Formamidlösung (Postfixationslösung) nachfixiert, erneut 5 min in 1x PBS gewaschen und über eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 95 %, 100 %) je 3 min dehydriert. Anschließend wurden die OT bei RT luftgetrocknet.

### 2.5.3 Denaturierung der Ziel-DNA

Vorbereitend zur Hybridisierung der Sonden-DNA an die Ziel-DNA wurde diese in Einzelstränge überführt. Die Ziel-DNA wurde mit Hilfe von Formamid denaturiert. Formamid verringerte die Stabilität der DNA-Doppelbindung. Dadurch wurde die Denaturierungstemperatur herabgesetzt und die Morphologie der Chromosomen weniger angegriffen.

Die Denaturierung der Ziel-DNA erfolgte auf einer Heizplatte bei 72°C. Auf dieser wurden die OT mit je 100 µl Formamid 70 für 3 min inkubiert. Zur Konservierung der DNA-Einzelstränge wurden die OT für 3 min in kaltes Ethanol (-20°C, 70 %) gegeben und anschließend jeweils 3 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (95 %, 100 %) dehydriert. Danach erfolgte eine Lufttrocknung bei RT.

### 2.5.4 Prähybridisierung

Die Prähybridisierung umfasste die Denaturierung der DNA-Sonden und einen Vorhybridisierungsschritt mit humaner Cot DNA. Die Denaturierung erfolgte wie bei der Ziel-DNA mit Formamid, so dass auch hier eine niedrigere Temperatur gewählt werden konnte. Die humane Cot DNA besteht aus repetitiven Sequenzen wie z.B. SINEs und LINEs. Sie blockt repetitive Sequenzen in den DNA-Sonden ab. Somit wurde eine spezifische Bindung an die Ziel-DNA gewährleistet.

Die Prähybridisierung der DNA erfolgte in einem Thermocycler. Die benötigten Volumen für die mikrosezierte DNA bzw. die BAC-DNA sind in Tab. 10 dargestellt. Die Cot DNA lag in lyophilisierter Form vor.



**Tab. 10: Volumen- bzw. Massenangaben für die Prähybridisierung der Sonden pro halben OT.**

Sonde	Volumen Sonde [µl]	Volumen Dextransulfat [µl]	Masse Cot DNA [µg]
BAC	7	5	10
WCP/PCP	5	7	10
MCB	7	5	10
mMCB	7	5	25

Die Prähybridisierung erfolgte im Thermocycler wie folgt:

1. 75°C      5'      Denaturierung
2. 4°C      2'      Konservierung Einzelstränge
3. 37°C      30'      Anlagerung Cot DNA an Sonden-DNA

Die Prähybridisierung der kommerziellen Sonden erfolgte ohne Cot DNA. Die erforderlichen Mengen sind in Tab. 11 zusammengefasst.

**Tab. 11: Volumenangaben für die Prähybridisierung der kommerziellen Sonden pro halben OT.**

Sonde	Firma	Volumen Sonde [µl]	Volumen Hybridisierungspuffer [µl]	Volumen <i>Aqua dest.</i> [µl]
Cep	QBIogene	2	8	0
Cep	Abbott	1	7	2
Subtelomer	Abbott	1	7	2

Die Prähybridisierung erfolgte im Thermocycler wie folgt:

1. 72°C      5'      Denaturierung
2. 4°C      bis zur Entnahme der Probe aus dem Cycler

Wurden für eine Hybridisierung verschiedene Sonden miteinander kombiniert, musste entsprechend die Menge an Dextransulfat bzw. kommerzieller Hybridisierungspuffer reduziert werden. Pro halben OT (Deckglas 24x24) wurden 10-12 µl Endvolumen Hybridisierungsmix genutzt.

### 2.5.5 Hybridisierung

Zu Beginn der Hybridisierung wurden die einzelsträngigen Sonden mit den ebenfalls einzelsträngig vorliegenden Chromosomen auf den OT zusammengeführt. Dazu

wurde das Volumen der Sonde auf eine Hälfte des OT pipettiert, luftblasenfrei mit einem 24x24 mm Deckglas abgedeckt und anschließend mit Fixogum abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C in einer feuchten Kammer über Nacht (mind. 16 h). Bei mMCB Sonden wurde für ein besseres Hybridisierungsergebnis 2 Tage hybridisiert (mind. 30 h).

### 2.5.6 Waschen und Detektion

Nach der Hybridisierung wurden überschüssige, ungebundene Sonden durch Waschschritte entfernt. Anschließend erfolgte bei indirekt markierten Sonden ein Detektionsschritt mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper.

Vorbereitend für das Waschen wurde eine Küvette mit 2x SSC im Wasserbad auf 62-65°C erwärmt. Das Fixogum wurde mittels einer Pinzette von den OT entfernt und die Deckgläser vorsichtig abgeschoben. Dann wurden die OT für 5 min in dem erwärmten 2x SSC inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschritt in 4x SSCT bei RT auf dem Schüttler.

Bei direkt markierten Sonden schloss sich direkt die Endwaschung an. Hierzu wurden die OT erneut in 4x SSCT bei RT auf dem Schüttler gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 95 %, 100 %) je 3 min dehydriert. Die Trocknung der OT erfolgte auf Grund der Fluoreszenzmarkierung der DNA im Dunkeln.

Bei indirekt markierten Sonden wurden die OT nach dem Waschen mit je 100 µl SSCTM überschichtet, mit einem 24x60mm Deckglas abgedeckt und 15 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt blockierte unspezifische Bindungsstellen der während der Detektion verwendeten Antikörper. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser entfernt und die OT kurz in 4x SSCT bei RT gewaschen. Die Detektion erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe Tab. 12). Die Wahl des Antikörpers und des Fluorochroms war abhängig von der Markierung der DNA und der ebenfalls auf dem OT hybridisierten Sonden.

**Tab. 12: Verwendete Antikörper während der Detektion, deren Hersteller, Wellenlängen, Verdünnung und notwendiges Hapten in den Sonden.**

Antikörper	Hersteller	Absorptions maximum [nm]	Emissions maximum [nm]	Verdünnung	Hapten
Avidin-Fluorescein-5-iso-Thiocyanat	Vector Laboratories	494	518	1:100	Biotin-16-dUTP
Anti-Digoxigenin-Fluorescein	Roche	494	518	1:20	Digoxigenin-11-dUTP
Anti-Digoxigenin-Rhodamin	Roche	596	615	1:20	Digoxigenin-11-dUTP
FluoroLink Cy5-labelled-streptavidin	Amersham	649	670	1:30	Biotin-16-dUTP

Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in SSCTM. Die OT wurden mit je 100 µl Antikörperlösung überschichtet, mit einem 24x60 mm Deckglas abgedeckt und 30-40 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Endwaschung nach dem gleichen Protokoll wie bei direkt markierten Sonden.

Nach der Lufttrocknung der OT im Dunkeln wurden die Chromosomen mit 20 µl DAPI/Antifade und unter Verwendung eines 24x60 mm Deckglases gegengefärbt. In dieser Form konnten die OT mehrere Wochen bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt werden.

#### 2.5.7 Auswertung

Die Auswertung der Chromosomenpräparate erfolgte am Axioplan 2 Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss). Dieses Mikroskop besitzt ein Fünffachfilterrad, das die Aufnahme von DAPI und den Fluorochromen FITC, Spectrum Orange, Texas Red, Cy 5 und DEAC nacheinander ermöglicht.

Die Bildaufnahme wurde mit einer Standard-CCD Videokamera (IMAC) durchgeführt. Die anschließende Bildverarbeitung erfolgte mit der ISIS Software (Metasystems GmbH, Altlussheim) sowie der Paint Shop Software (Microsoft, Version 4.14).

#### 2.5.8 Auswertung der BAC-Signale

Die Auswertung der BAC-Signale erfolgte mit der Scion Image Software (Scion Corporation, Version Beta 4.0.3). Dafür wurden die Bilder im ISIS mit einer CCD Kamera aufgenommen und in Paint Shop exportiert. Im Paint Shop wurden die farbigen Pixel der Signale in Graustufen umgewandelt und das Bild im unkomprimierten TIFF Format gespeichert. Anschließend wurde das Bild mit Scion geöffnet und die zu messenden BAC-Signalstärken auf den jeweiligen homologen Chromosomen mit einem Rahmen markiert. Die Software maß die Pixel pro Fläche der Signale und gab dafür einen Zahlenwert an. Um beide Zahlenwerte miteinander vergleichen zu können, wurde der größere der beiden Werte als 100 % und der andere dazu prozentual ins Verhältnis gesetzt. So erhielt man für die Signale Zahlenwerte, die miteinander verglichen werden konnten.

#### 2.5.9 FISH auf Spermiensuspension

Die FISH auf Spermiensuspensionen erfolgte nach einem veränderten Protokoll. Die OT wurden, wie unter 2.1.4 beschrieben, präpariert und mindestens 2 Tage bei RT einem Alterungsprozess unterzogen. Die Vorbehandlung der OT für FISH erfolgte in einer Küvette mit 2x SSC, das auf 37°C erwärmt wurde. Die OT wurden 10 min in der Küvette inkubiert. Anschließend wurden die OT 5 min bei RT in 1x PBS gewaschen und 10 min in einer 37°C warmen HCl-Lösung (50 ml 0,01 N HCl + 25 µl Pepsin (20mg/ml)) inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift für 5 min bei RT in 1x PBS, bevor die Chromosomen auf den OT in einer aufsteigenden Ethanolreihe je 3 min dehydriert wurden (70 %, 95 %, 100 %). Die OT wurden 5 min bei RT luftgetrocknet. Anschließend wurden die OTs mit jeweils 100 µl NaOH-Lösung (5 µl 0,5 M NaOH + 95 µl *Aqua dest.*) und einem Deckglas überschichtet und 9 min (2 Tage alte OT) bzw.

11 min (3 Tage alte OT) inkubiert. Es schlossen sich 2 Waschschritte für jeweils 3 min bei RT in 2xSSC an, gefolgt von einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 95 %, 100 %) ebenfalls für jeweils 3 min. Nach einer Lufttrocknung der OTs für 5 min, wurden die Chromosomen auf den OTs 3 min bei 73°C in Formamid 70 denaturiert. Anschließend erfolgte eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 95 %, 100 %) für je 3 min und eine erneute Lufttrocknung für 5 min. Danach war die Vorbehandlung der OTs abgeschlossen und die Hybridisierung konnte, wie unter 2.5.5 beschrieben, gestartet werden.

Die Probenvorbereitung sowie das Waschen und Detektieren erfolgte nach Standardprotokoll (siehe 2.5.4 und 2.5.6)

.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Identifizierung kryptischer Aberrationen bei akuten myeloischen Leukämien mit zytogenetisch unauffälligem Karyotyp

##### 3.1.1 Vorarbeiten mittels micro-CGH

Im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Melanie Glaser wurden 17 der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten 31 AML-Fälle mit zytogenetisch normalen Karyotyp bereits teilweise molekularzytogenetisch untersucht. Die hierfür verwendete Methode war die micro-CGH (siehe 1.3.5). Gesammelt wurden pro Fall ca. 15-20 leukämische Zellkerne sowie Zellkerne eines gesunden Spenders. Mit der Methode der micro-CGH wurde bei 2 der 17 untersuchten Patienten ein Zugewinn an Tumor-DNA im Chromosom 19 detektiert. Dieser konnte jedoch in einer zweiten Untersuchung mit Hilfe des mMCB nicht bestätigt werden. Zusätzlich wurden kommerzielle Subtelomersonden für den p- und den q-Arm von Chromosom 19 auf beide Fälle hybridisiert. Auch in diesem Fall war weder im Interphasekern noch in den Metaphasechromosomen eine Aberration nachweisbar. Ein dritter Fall zeigte in der micro-CGH eine Monosomie 19 und einen Verlust von Tumor-DNA im Zentromer- und Subzentromerbereich von Chromosom 17. Auch diese Aberrationen konnten mit Hilfe von weiteren FISH-Sonden nicht bestätigt werden. Bei den verbleibenden 14 Patienten konnten mit der micro-CGH keine kryptischen Aberrationen nachgewiesen werden.

##### 3.1.2 Untersuchungen mittels mMCB

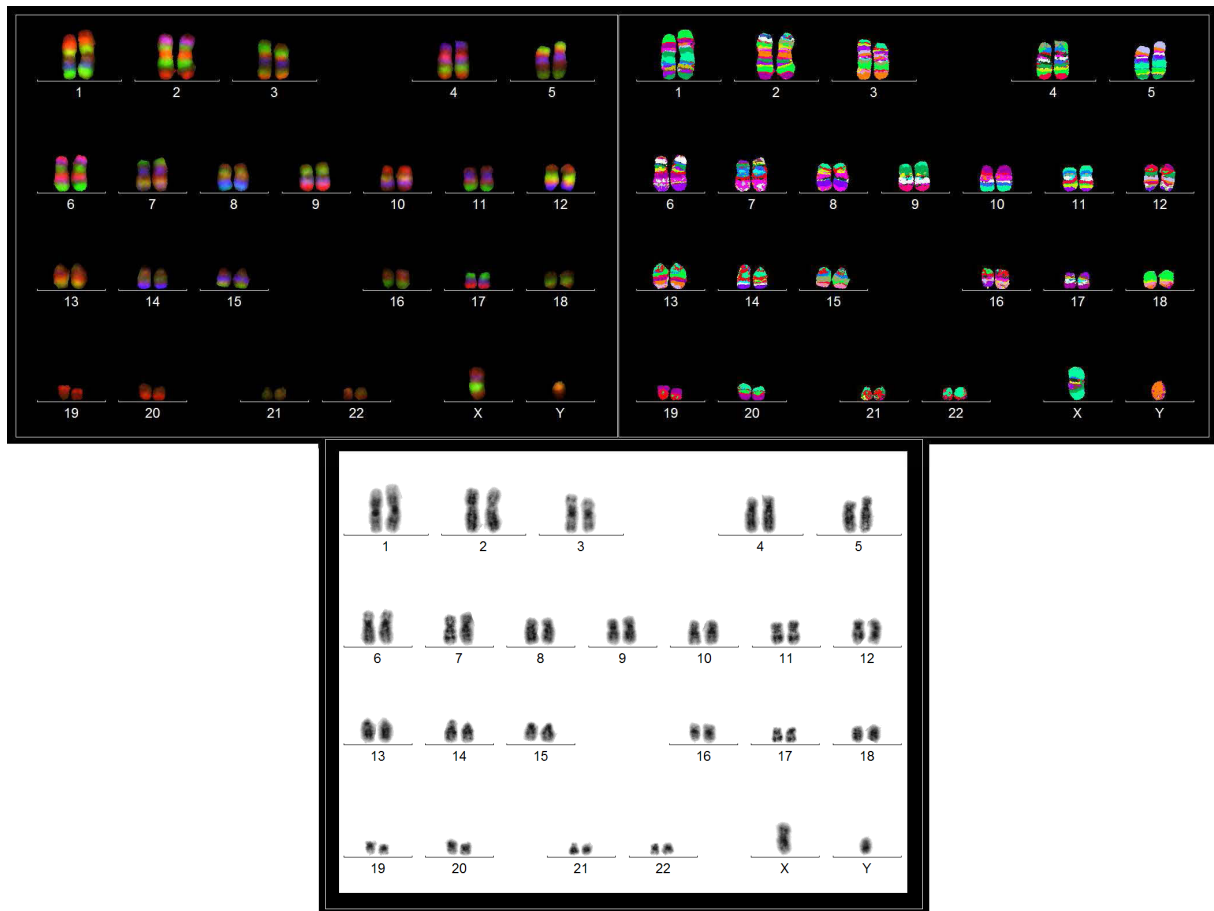
Im Rahmen dieser Arbeit wurde zytogenetisch aufgearbeitetes Knochenmark von 31 AML-Fällen mit bänderungszytogenetisch unauffälligem Karyotyp mit mMCB untersucht. Die Markierung des verwendeten DNA-Sondensets ist in Abb. 28 im Anhang dargestellt. Pro Fall wurden mindestens 15 Metaphaseplatten (MPP) ausgewertet. Die Auswertung erfolgte anhand der Fluoreszenzprofile sowie der von der Computersoftware ISIS generierten Pseudofarben. Eine Aberration wurde protokolliert, wenn sie in mindestens zwei Metaphasen auftrat. Sonst wurde die Aberration als eine Einzelzellaberration gewertet und nicht vermerkt. Die Ergebnisse sind in Tab. 43 im Anhang zusammengefasst.

In 12 der 31 untersuchten Fälle wurden keine Aberrationen gefunden. Der zytogenetisch unauffällige Karyotyp wurde bestätigt. Als Beispiel zeigt die Abb. 3 das Hybridisierungsergebnis des Falls 28.

In weiteren fünf Fällen war keine semistatistische Auswertung möglich, da die Anzahl der zu analysierenden Metaphasen zu gering war. Von diesen Patienten wurden Knochenmarkzellsuspensionen verschiedener Kultivierungszeiten (24 h, 48 h, 72 h) verwendet. Dies führte jedoch zu keiner Steigerung der auswertbaren MPP.

In 2 der 31 Fälle war ebenfalls keine Auswertung möglich, da hier der limitierende Faktor nicht die Anzahl der MPP, sondern die Hybridisierungsqualität war. Die Hybridisierung wurde mehrmals wiederholt. Die Fluoreszenzsignale waren aber zu schwach, um eine definitive Aussage treffen zu können.

Bei den verbleibenden 12 AML-Fällen, also in etwa 40 % der Fälle, wurden mMCB Aberrationen gefunden. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.



**Abb. 3: Zusammenfassende Darstellung des Hybridisierungsergebnisses des mMCB auf Suspension des Falls 28.** Das linke obere Bild zeigt das Karyogramm nach mMCB mit den Fluoreszenzfarbkanälen TR, Cy5 und DEAC. Im rechten oberen Bild sind die von der Computersoftware ISIS generierten Pseudofarben und im unteren Bild die Chromosomen im invertierten DAPI dargestellt. In den Fluoreszenzsignalen der homologen Chromosomen konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden.

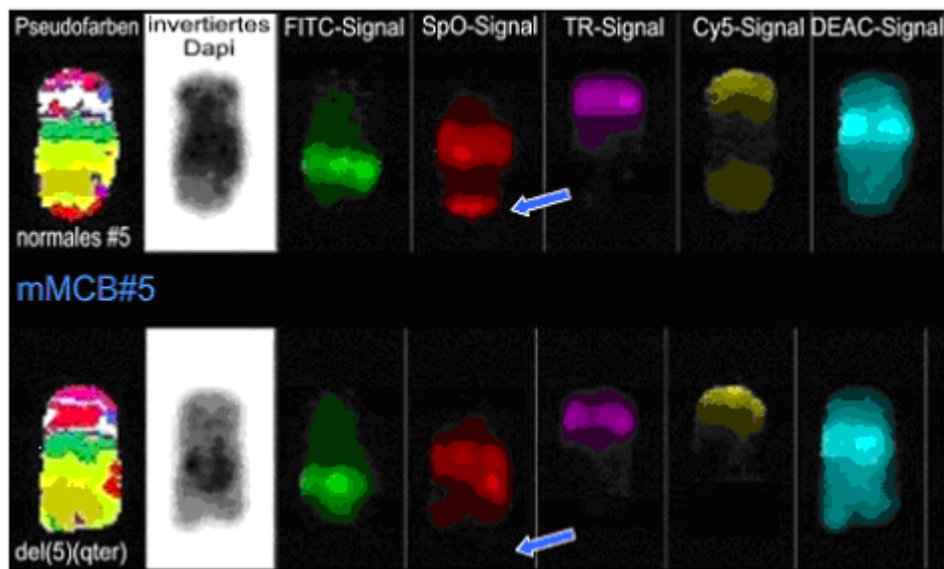
### 3.1.2.1 Detektierte Aberrationen mit mMCB und deren Bestätigung durch den Einsatz lokusspezifischer Sonden

Wie bereits oben erwähnt, wurden mit der FISH-Methode des mMCB in 40 % der Fälle Aberrationen detektiert. Diese Veränderungen wurden durch den Einsatz lokusspezifischer FISH-Sonden teilweise bestätigt und näher charakterisiert. Pro Sonde wurden mindestens 30 MPP ausgewertet. Eine Aberration wurde protokolliert, wenn sie in mindestens zwei MPP nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 zusammengefasst.

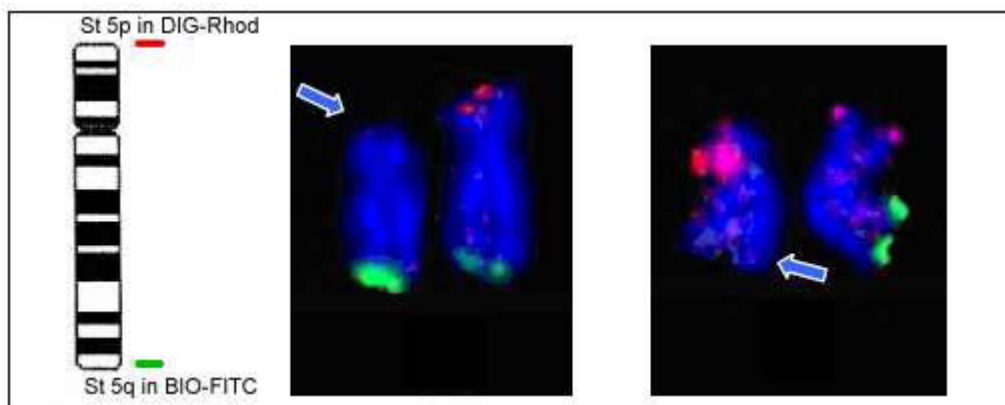
**Tab. 13: Ergebnisse der Hybridisierung der DNA-Sonden des mMCB und weiterer lokusspezifischer Sonden auf NK-AML Fälle.**

Fall	Erstdiagnose (ED)	Geschlecht	Alter bei ED	Ergebnis mMCB	Anzahl untersuchter Metaphasen mMCB	weitere FISH-Sonden	Ergebnis FISH
1	AML-M6	männlich	57	auffällig #6, St 2pq, 5pq, 8pq, 10pq, 22q	53	mFISH, MCB6, St 2pq, 5pq, 8pq, 10pq, 22q	unauffällig
2	AML-M2	männlich	62	auffällig #9, St 22q	21	AML1-ETO, MCB-Bank 9-2, Sc-Mix9, St 22q	unauffällig
3	AML-M2	männlich	71	auffällig #16	17	MCB16	unauffällig
4	AML-M1	männlich	36	unauffällig	18	-	unauffällig
5	AML-M6	männlich	62	auffällig St 5p, 5q	22	St5pq	46,XY[13]/46,XY,del(5)(pter)[11]/46,XY,del(5)(qter)[4]
6	AML-M1	männlich	68	unauffällig	15	-	unauffällig
7	AML-M4	weiblich	53	unauffällig	15	-	unauffällig
8	AML-M2	weiblich	74	unauffällig	20	-	unauffällig
9	AML-M2	männlich	43	auffällig #9, St 22q	19	MCB9, St 22q	unauffällig
10	AML aus MDS	männlich	55	zu wenige MPP	-	-	-
11	AML-M4	männlich	64	schlechte Hybridisierungsqualität	-	-	-
12	AML aus MDS	männlich	34	unauffällig	16	-	unauffällig
13	AML-M5b	weiblich	48	unauffällig	20	-	unauffällig
14	AML-M2	männlich	78	schlechte Hybridisierungsqualität	-	-	-
15	AML aus MDS	männlich	65	unauffällig	14	-	unauffällig
16	AML-M2	männlich	48	unauffällig	12	-	unauffällig
17	AML-M1	männlich	54	zu wenige MPP	-	-	-
18	AML-M1	weiblich	66	unauffällig	17	-	-
19	AML-M1	männlich	70	auffällig St 11q, #12	15	St 11pq, MCB12	unauffällig
20	AML-M0	weiblich	62	unauffällig	20	-	-
21	AML-M1	männlich	38	zu wenige MPP	-	-	-
22	AML-M4	männlich	65	zu wenige MPP	-	-	-
23	AML-M4	männlich	58	zu wenige MPP	-	-	-
24	AML aus MDS	weiblich	61	auffällig #10, St 2p, 9q, 10q	20	MCB10, Sc-Mix10, St 9q, St 10q	unauffällig
25	AML-M2	männlich	27	auffällig St 1q	15	St 1q	unauffällig
26	AML-M0	männlich	49	auffällig St 1pq, 2pq, 5q	20	St 1pq, St 2p, St 2q, St 5q	46,XY[55]/46,XY,del(2)(qter)[5]
27	AML-M4	weiblich	41	auffällig St 1q, 4q, 7q, 10q,	19	St 1q, 4q, 7q, 10q	unauffällig
28	AML-M1	männlich	44	auffällig 14p+	19	Md54, 16qh, Md 18 (9qh)	46,XY,14ph+
29	AML-M4	männlich	43	unauffällig	21	-	unauffällig
30	AML-M6	weiblich	69	auffällig 14p+	10	Md54, 16qh, Md 18 (9qh)	46,XX,14ph+
31	AML-M3	weiblich	37	unauffällig	12	-	unauffällig

Bei zwei Fällen (Fall 5 und 26) konnten die durch mMCB beschriebenen Veränderungen mit lokusspezifischen Sonden bestätigt werden. Im Rahmen der Untersuchung von Fall 5 wurden drei verschiedene Klone dokumentiert: 46,XY[13]/46,XY,del(5)(p15.5)[11]/46,XY,del(5)(q35)[4] (siehe Abbildungen 4 und 5). Bei Fall 26 wurden nach mMCB Aberrationen in den Subtelomerbereichen von 1p, 1q, 2p, 2q und 5q nachgewiesen. Nach der Hybridisierung konnte nur in 2q eine Deletion bestätigt werden. Diese wurde in 5 von 60 MPP detektiert.



**Abb. 4: Darstellung der Hybridisierungsergebnisse des Chromosoms 5 nach mMCB im Fall 5.** Von rechts nach links abgebildet sind die von der Computersoftware ISIS generierten Pseudofarben, das invertierte DAPI, die einzelnen Farbkanäle und die dazugehörigen Fluoreszenzprofile. Die Pfeile weisen auf die deletierte Region hin.



**Abb. 5: Ergebnisse der Hybridisierung der Subtelomerproben des Chromosoms 5 auf Suspension des Falls 5.** Der BAC des Subtelomers 5p (RP11-189N21) wurde indirekt markiert und mit einem Antikörper, an den ein roter Fluoreszenzfarbstoff (Rhodamin) gebunden war, detektiert. Der BAC im Subtelomerbereich 5q (RP11-240G13) wurde ebenfalls indirekt markiert und mit einem Antikörper, an den ein grüner Fluoreszenzfarbstoff (FITC) gebunden war, nachgewiesen. Die Pfeile zeigen die deletierten Regionen in 5p bzw. 5q.



### 3.1.3 Untersuchungen Subtelomerbereiche

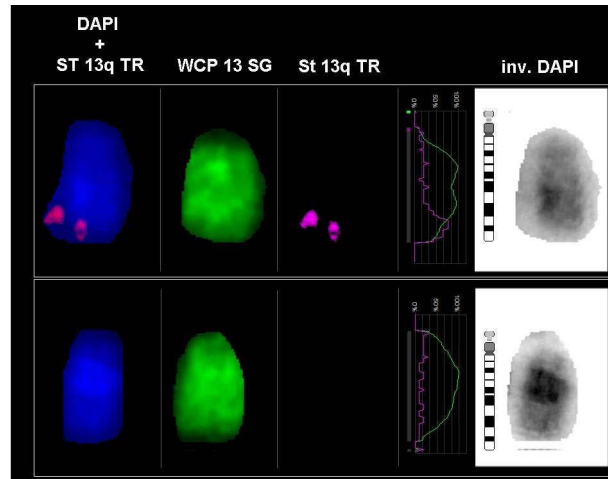
Mit Hilfe des mMCB waren häufig Auffälligkeiten in den Subtelomerbereichen der Chromosomen sichtbar geworden. Da die Signalstärken des mMCB zu den Telomeren hin schwächer werden, ist oftmals eine eindeutige Aussage über Auffälligkeiten in diesen Bereichen nicht möglich. Aus diesem Grund wurden BACs aus den Subtelomerbereichen von 5q, 9p, 11p, 11q, 12 p und 13 q ausgewählt und zu FISH-Sonden aufgearbeitet. Diese fünf Chromosomenregionen waren nach mMCB bei den untersuchten Leukämien am häufigsten deletiert. Die verwendeten BACs sind in Tab. 44 im Anhang zusammengefasst. Es wurden, mit Ausnahme von Chromosom 5, mindestens drei BACs aus der gleichen Region in einer Farbe markiert und zusammen hybridisiert. Dies erleichterte auf Grund stärkerer Signale die Auswertung in den Interphasekernen.

Die Experimente wurden von Frau Dr. Hasmik Mkrtchyan im Rahmen ihres dreimonatigen Gastaufenthaltes am Institut für Humangenetik und Anthropologie in Jena durchgeführt. Insgesamt wurden 22 der 31 AML-Fälle mit zytogenetisch normalem Karyotyp untersucht. Die BAC-Klone der jeweiligen Chromosomen wurden in einer Farbe markiert (TR oder SG) und zusammen in einem Mix hybridisiert. Die Auswertung erfolgte an MPP und Interphasekernen. Für letztere wurde im Vorfeld zur Bestimmung der Nachweisgrenze der Sonden für eine Aberration eine Hybridisierung an einem zytogenetisch unauffälligen Probanden durchgeführt. Für jede Sonde wurden die Signale in 150 Interphasekernen gezählt. Auf Grund der Hybridisierung mehrerer BACs aus einer Region in einem Mix, waren die Signale im Interphasekern stärker und somit leichter auszuwerten. Die Ergebnisse sind in Tab. 45 im Anhang zusammengefasst. Unter Zugrundelegung dieser Auswertung wurde der Grenzwert für eine Aberration auf 5 % der Interphasekerne gesetzt. Bei Metaphasen wurde eine Aberration protokolliert, wenn sie in mindestens zwei Metaphasen beschrieben wurde. Die Auswertung erfolgte pro Fall und Sonde an mindestens 15 MPP bzw. 150 Interphasekernen.

Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in Tab. 14 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass in 7 der 22 untersuchten Fälle keine Aberrationen nachweisbar waren (Fälle Nr. 4, 7, 12, 19, 21, 23 und 26). In 4 dieser 7 Fälle war keine Auswertung der Metaphasen möglich, da die Anzahl zu gering oder zu wenig Suspension vorhanden war. Hier ließen sich nur die Interphasekerne untersuchen, die keine Auffälligkeiten aufwiesen. Die verbliebenen 14 der untersuchten 22 Fälle zeigten Aberrationen in Form von Deletionen oder Duplikationen in den untersuchten Chromosomen. Dabei wurden bei fünf Fällen zwei oder drei klonale Veränderungen in den Zellen nachgewiesen. Diese konnten entweder in den proliferierenden oder den nicht proliferierenden Zellen bzw. auch in beiden gleichzeitig beschrieben werden. Die Abb. 6 zeigt eine Deletion im Subtelomerbereich von 13q, die bei Fall 13 nachgewiesen wurde.

**Tab. 14: Ergebnisse der Hybridisierung der BACs der Subtelomerbereiche auf NK-AML Fälle.**

Fall	ED	Geschlecht	Alter bei ED	Blastenzahl [%]	Analyse Metaphase	Analyse Interphase	Ergebnis
1	AML-M6	männlich	57	54	del(13)(q34)(3/28)	del(13)(q34)(8,18%)	del(13)(q34)
2	AML-M2	männlich	62	63,2	del(5)(q35.3)(2/20)	del(12)(p13.33)(6%) (keine Daten für 5q)	del(12)(p13.33)
3	AML-M2	männlich	71	84	del(9)(p24.3)(5/15)	del(9)(p24.3)( 6,75%)	del(9)(p24.3)
4	AML-M1	männlich	36	88,5	keine Daten	unauffällig (keine Daten für 9p)	unauffällig
5	AML-M6	männlich	62	80-90	-	-	-
6	AML-M1	männlich	68	20-25	del(5)(q35.3)(3/18)	unauffällig (keine Daten für 13q)	del(5)(q35.3)
7	AML-M4	weiblich	53	100	unauffällig	unauffällig	unauffällig
8	AML-M2	weiblich	74	39	del(12)(p13.33)(3/21), dup(12p13.33)(5/21)	del(9)(p24.3)(7%), dup(12)(p13.33)(13%)	del(9)(p24.3), del(12p13.33), dup(12)(p13.33)
9	AML-M2	männlich	43	28	del(5)(q35.3)(3/32),del (12)(p13.33)(2/29)	unauffällig	del(5)(q35.3), del(12)(p13.33)
10	AML aus MDS	männlich	55	16	-	-	-
11	AML-M4	männlich	64	91	del(13)(q34)(5/8) (keine Daten für 5q,	del(11)(q25)(16,37%),del(13)(q34)(1 7,12%)(keine Daten für 5q)	del(11)(q25),del(13)(q34)
12	AML aus MDS	männlich	34	13,6	unauffällig	unauffällig (keine Daten für 11p, 13q)	unauffällig
13	AML-M5b	weiblich	48	10	del(9)(p24.3)(4/16),del (13)(q34)(4/12)	unauffällig	del(9)(p24.3), del(13)(q34)
14	AML-M2	männlich	78	82	del(11)(p15.5)(2/17)	del(12)(p13.33)(10,47%)	del(12)(p13.33)
15	AML aus MDS	männlich	65	20	del(5)(q35.3)(3/20), del(11)(p15.5)(3/14)	del(5q35.3)(5%), del(11p15.5)(13%)	del(5)(q35.3), del(11)(p15.5)
16	AML-M2	männlich	48	30-35	del(11)(p15.5)(5/33), del(11)(q25)(3/33)	del(11)(p15.5)(13%)	del(11)(p15.5)
17	AML-M1	männlich	54	81,3	keine Daten	del(12p13.33)(15,13%)	del(12p)(13.33)
18	AML-M1	weiblich	66	100	-	-	-
19	AML-M1	männlich	70	60	keine Daten	del(12)(p13.33)(5,03%)	unauffällig
20	AML-M0	weiblich	62	-	-	-	-
21	AML-M1	männlich	38	-	zu wenig MPP	del(13)(q34)(5,06%)	unauffällig
22	AML-M4	männlich	65	-	-	-	-
23	AML-M4	männlich	58	90	zu wenig MPP	unauffällig	unauffällig
24	AML aus MDS	weiblich	61	88	zu wenig MPP	del(11)(q25)(5,26%), dup(11q25)(13,45%)	dup(11)(q25)
25	AML-M2	männlich	27	-	-	-	-
26	AML-M0	männlich	49	-	unauffällig (keine Daten für 5q und 9q)	del(13)(q34) (5,13%)	unauffällig
27	AML-M4	weiblich	41	50	-	-	-
28	AML-M1	männlich	44	80-90	unauffällig (keine Daten für 5q)	dup(12)(p13.33)(7,10%)	dup(12)(p13.33)
29	AML-M4	männlich	43	100	-	-	-
30	AML-M6	weiblich	69	36	-	-	-
31	AML-M3	weiblich	37	-	-	-	-



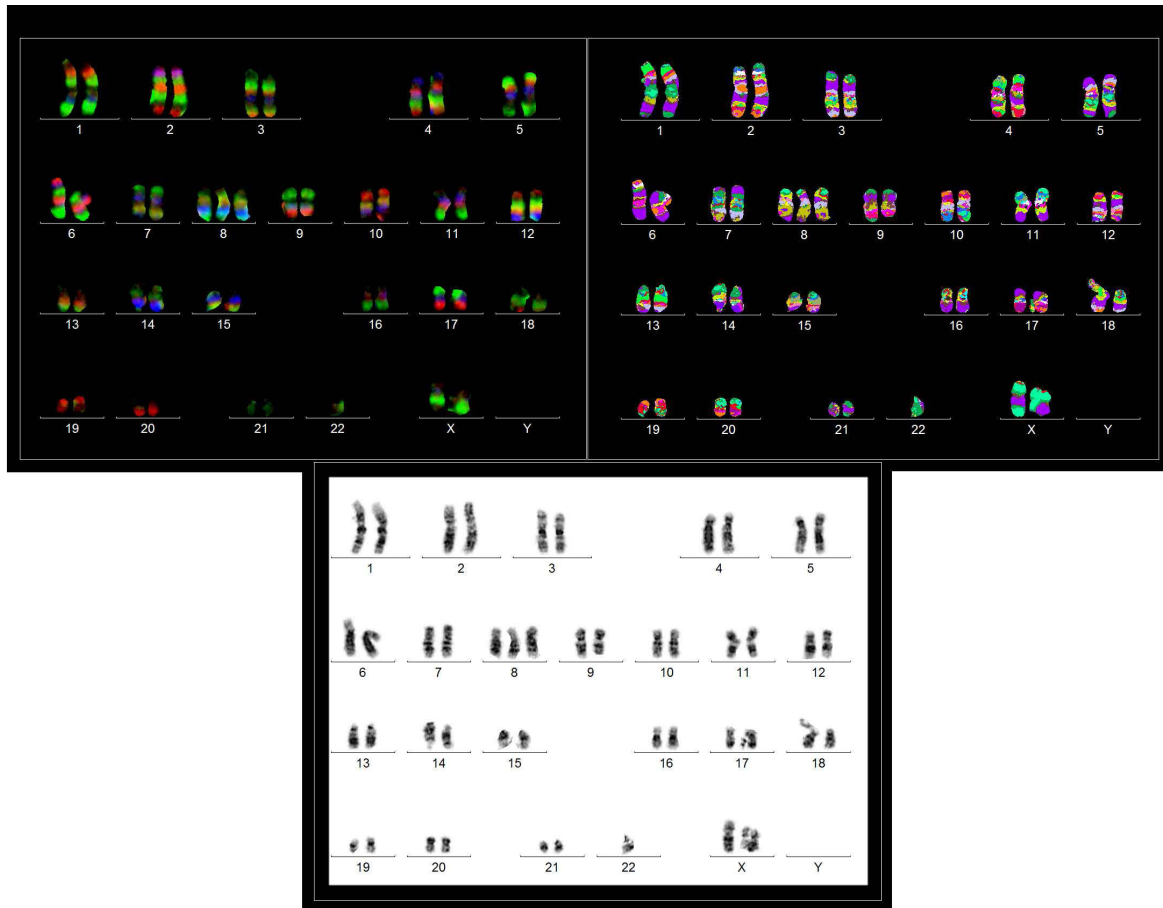
**Abb. 6: Darstellung der Hybridisierung der BACs vom St 13q auf Material des Falls 11.** Die BACs wurden direkt mit TR markiert. Als Kontrolle für das Chromosom 13 wurde zusammen mit den BACs ein wcp 13 in SG hybridisiert. Dargestellt sind die homologen Chromosomen 13. Das Signal der BAC-Klone ist auf Grund der Deletion nur auf einem der beiden Chromosomen nachweisbar.

### 3.2 Identifizierung kryptischer Aberrationen bei akuten myeloischen Leukämien mit Trisomie 8 als einzige Aberration

#### 3.2.1 Untersuchungen mittels mMCB

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 6 von 13 AML-Fällen mit Trisomie 8 molekularzytogenetisch mittels mMCB untersucht. Das Markierungsschema der verwendeten DNA-Sonden ist in Abb. 28 im Anhang dargestellt. Pro Fall wurden mindestens jeweils 15 MPP mit Trisomie 8 und ohne Trisomie 8 ausgewertet und eine Aberration protokolliert, wenn sie in mindestens zwei MPP zu finden war. Die Ergebnisse sind in Tab. 46 im Anhang zusammengefasst.

Das Material von 2 der 6 Fälle wies zu wenige Metaphasen für eine aussagekräftige Auswertung auf, so dass hier die Auswertung keine Aussage über das Vorhandensein von Aberrationen zuließ. Bei den anderen vier Fällen wurden nach mMCB-Auswertung keine Auffälligkeiten gefunden, d.h. der Karyotyp blieb molekularzytogenetisch unauffällig. In der Abb. 7 ist das Hybridisierungsergebnis des Falls 10 dargestellt. Bei diesem Fall wurde bei der Auswertung eine Besonderheit beobachtet. In 12 von 16 Metaphasen lag eins der beiden homologen X-Chromosomen gekrümmt vor, davon in zehn Metaphasen freiliegend, d.h. nicht von anderen Chromosomen räumlich begrenzt. Dieses Phänomen wurde nur bei Fall 10 beobachtet und konnte auf Grund der fehlenden Methoden nicht näher untersucht werden.



**Abb. 7: Ergebnis der Hybridisierung des mMCB auf die Chromosomen des Falls 10.** Die Darstellung ist die Gleiche wie in Abb. 6. Die Auswertung zeigte keine Veränderungen in den Fluoreszenzsignalen zwischen den homologen Chromosomen.

### 3.2.2 Untersuchungen Subtelomerbereiche

Nach der Auswertung der Hybridisierungsergebnisse nach mMCB wurden die sechs oben erwähnten Trisomie 8 Fälle mit Subtelomerproben von 9q, 11p und 12p untersucht. Die verwendeten DNA-Sonden sowie die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tab. 47 im Anhang zusammengefasst. Zwei der Fälle konnten auf Grund der geringen Anzahl an Metaphasen nicht ausgewertet werden. In den restlichen vier Fällen wurden jeweils mindestens 15 MPP bewertet, sowohl mit als auch ohne Trisomie 8. Es zeigte sich, dass in keinem der Fälle Aberrationen in den Subtelomerregionen zu finden waren. Folglich konnten keine Deletion, Duplikation oder Translokation nachgewiesen werden.

### **3.3 Etablierung einer neuen FISH Methode zur Unterscheidung homologer Chromosomen: pod-FISH**

#### **3.3.1 Vorarbeiten zur Validierung von pod-FISH**

##### **3.3.1.1 Auswahl und Test der DNA-Sonden**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 485 BAC-Klone aus 338 verschiedenen chromosomalen Regionen verwendet (siehe 2.2.2). Die BAC-Klone wurden so gewählt, dass sie innerhalb von publizierten, polymorphen Regionen der CNVs lagen. Es wurden größtenteils Regionen ausgesucht, in denen ein Verlust an DNA beschrieben wurde, die in mehr als einem Probanden gefunden wurden und die größer als 150 kb waren. Des Weiteren wurde ein gewisser Abstand der BACs innerhalb eines Chromosoms gewählt. Dies erleichterte die Auswertung nach FISH, da sich die Signale eines jeden BAC-Klons voneinander abgrenzten.

Die verwendeten BAC-Klone wurden bezüglich der in der FISH erzielbaren Signalstärken, ihrem Kartierungsort und eventuell vorhandener Kreuzhybridisierungen an Suspensionen zweier klinisch unauffälliger Probanden getestet (siehe Tab. 40 im Anhang). Es zeigte sich, dass 8 % der BACs kein spezifisches Signal aufwiesen. Diese BACs wurden in die weiteren Experimente nicht mit einbezogen. Ca. 35 % der BACs wiesen Kreuzhybridisierungen auf dem gleichen oder einem bzw. mehreren anderen Chromosomen auf. Diese BACs wurden nicht mit in den gesamtgenomischen Mix einbezogen (siehe 3.3.2).

Da die BACs in polymorphen Regionen lagen, die innerhalb der homologen Chromosomen in ihrer Größe variieren könnten, wurden sie auf Signalunterschiede zwischen letzteren hin analysiert. Die Auswertung der Signalunterschiede erfolgte visuell. Es zeigte sich, dass bei 32 % der BACs Signalunterschiede zwischen den homologen Chromosomen in mindestens einer der beiden Testsuspensionen auftraten, die BACs folglich als informativ beschrieben wurden.

Für die nachfolgend aufgeführten Experimente wurde die maximale Anzahl an BAC-Klonen für jedes Chromosom eingesetzt. In jedem Experiment wurden mindestens 15 MPP ausgewertet.

##### **3.3.1.2 Optimierung der Signalstärke**

Während der Auswertung der BAC-Signale kristallisierte sich folgende Herausforderung heraus. Die Signalstärke der BAC-Klone variierte sehr stark. Es fanden sich innerhalb einer Hybridisierung auf einer Testsuspension Metaphasen mit Signalunterschieden neben Metaphasen ohne Signalunterschiede, unabhängig von der Lage des Chromosoms innerhalb der Metaphase. Des Weiteren variierte auch die Signalintensität von schwacher bis hin zu starker Intensität.

Auf Grund dessen wurde die Markierungs-PCR ersetzt durch die Nicktranslation (siehe 2.3.3). Die Nicktranslation bietet den Vorteil, dass statistisch in jede 20.- 25. Stelle der DNA ein fluorochrommarkiertes Nukleotid eingebaut wird. Dies geschieht durch den Einsatz einer festgelegten DNA Konzentration, auf die der Nicktranslationsmix der Firma Roche optimiert ist (<http://www.roche-applied-science.com/pack->

insert/1745808b.pdf, Stand April 2008). Die mit dieser Methode markierten BACs wurden erneut auf den bereits verwendeten Suspensionen getestet. Bei der Auswertung am Material zeigte sich eine verbesserte Signalstärke der BACs. Die Signale waren stärker und konstanter. Wurde ein Signalunterschied der BACs zwischen den homologen Chromosomen nachgewiesen, dann zeigte sich dieser in mindestens 70 % aller ausgewerteten Metaphasen. Letztendlich wurde das Protokoll, wie in 2.5.6 beschrieben, verwendet.

### 3.3.1.3 Auswertung der Signale mit der Software Scion

Eine visuelle Auswertung der BAC-Signale birgt die Gefahr einer subjektiven Einschätzung des Signalunterschiedes, abhängig von der Erfahrung der Person, die auswertet. Um dies zu verhindern, wurde neben der visuellen Auswertung eine geeignete Software zum Messen der Signalstärke gewählt, die frei im Internet zugängliche Software Scion (siehe 2.5.8).

### 3.3.1.4 Definition Signalunterschied

Bei der visuellen Auswertung der BAC-Signale wurde ein Signalunterschied protokolliert, wenn sich beide Signale in ihrer Größe deutlich unterschieden und in mindestens 70 % der Metaphasen nachgewiesen wurden. Die Erstellung eines Grenzwertes für einen Signalunterschied war nicht möglich. Jedoch bewirkte die softwaregestützte Auswertung der BAC-Signale mit Scion das Erstellen einer Grenze als Definition eines Signalunterschiedes. Für deren Bestimmung wurden drei kommerzielle Sonden ausgewählt, die sich in Regionen befanden, in denen keine CNVs publiziert waren. Diese Sonden wurden auf eine Testsuspension eines klinisch unauffälligen Probanden, eine Knochenmarksuspension eines Patienten mit AML und den Fall N hybridisiert (siehe 2.1). Nach der visuellen Beurteilung der Signalunterschiede wurde die Software Scion angewendet (siehe 2.5.8). Der prozentuale Anteil des kleineren Signals schwankte zwischen 72 und 80 %, was einer Abweichung von 20 bis 28 % entspricht (siehe Tab. 15). Weiterhin wurden drei BAC-Klone ausgewählt, die in keiner publizierten CNV-Region lagen und direkt in SO und SG markiert. Auch hier schwankte der prozentuale Anteil des kleineren Signals unabhängig von der gewählten Suspension oder des Fluorochroms zwischen 71 und 80 %. Schließlich wurden drei BAC-Klone gewählt, die in CNV-Regionen lagen und die in vorangegangenen Hybridisierungen keine Signalunterschiede auf den gewählten Suspensionen zeigten. Der prozentuale Anteil des kleineren Signals lag in ähnlicher Größenordnung wie bei den kommerziellen Sonden sowie den BACs aus den nicht polymorphen Regionen.

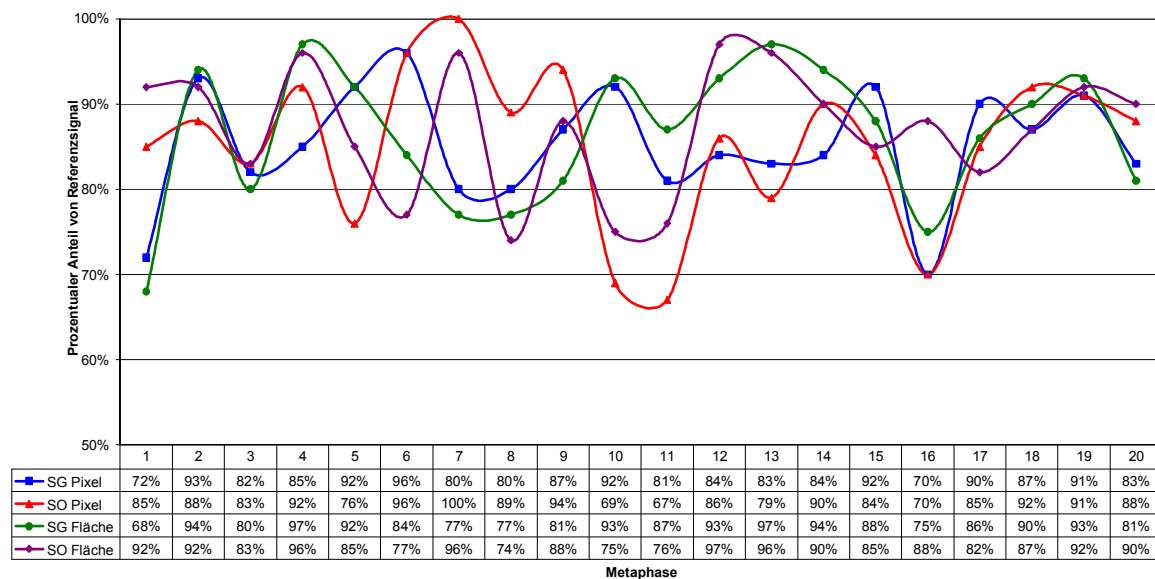
**Tab. 15: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Bestimmung des Grenzwertes.** Von links nach rechts sind aufgeführt: die verwendete DNA-Sonde, deren Herkunft und chromosomale Lokalisation, die Markierung der DNA-Sonde mit Fluoreszenzfarbstoffen, die verwendete Suspension, das größere der beiden Signale (Referenzsignal (RS)), das als 100 % gesetzt wird, das kleinere Signal, dessen Größe in Abweichung vom Referenzsignal in Prozent angegeben ist und die prozentuale Abweichung beider Signale.

DNA Sonde	Herkunft	Chromosom	Markierung	Suspension	RS [%]	2. Signal (Ø) [%]	Abweichung [%]
LSI BCR/ABL	Vysis	LSI ASS/ABL 9q34/ LSI BCR 22q11.2	LSI ASS/ABL SO/ LSI BCR SG	Lymphozyten	100	75	25
				Knochenmark	100	73	27
				Fall N	100	77	23
LSI Kallmann	Vysis	Xp22.3	SO	Lymphozyten	100	72	28
				Knochenmark	100	75	25
				Fall N	100	75	25
RP11-358M9	BAC (keine CNV Region)	2q31	SO	Lymphozyten	100	73	27
			SG	Knochenmark	100	80	20
			SO	Fall N	100	73	27
RP11-175A7	BAC (keine CNV Region)	2p13	SG	Lymphozyten	100	73	27
			SO	Knochenmark	100	80	20
			SG	Fall N	100	73	27
RP11-356G3	BAC (keine CNV Region)	7q22	SO	Lymphozyten	100	71	29
				Knochenmark	100	75	25
				Fall N	100	79	21
RP11-2F9	BAC (CNV Region)	15q11.2	SG	Lymphozyten (1)	100	76	24
				Lymphozyten (2)	100	73	27
				Lymphozyten (3)	100	73	27
RP11-477L23	BAC (CNV Region)	15q13.1	DEAC	Fall N	100	82	18
			TR	Fall N	100	74	26
RP11-261B23	BAC (CNV Region)	15q13.2	DEAC	Fall N	100	94	6
			SO	Fall N	100	80	20

Weiterhin wurden zwei verschiedene Messarten mit Scion getestet. Die Signalstärke konnte entweder als Pixel pro Fläche oder als gesamte Fläche des Signals gemessen werden. Es wurden drei verschiedene DNA-Sonden ausgewählt und auf mehrere Testsuspensionen hybridisiert. Beide Verfahren zeigten die gleichen prozentualen Ergebnisse (siehe Tab. 16 und Abb. 8). Da das Messen der Fläche (Bestimmung der Größe der Fläche erfolgt manuell) weniger exakt ist als das Messen der Pixel (Bestimmung der Größe erfolgt automatisch durch die Software), wurde darauf in den folgenden Experimenten verzichtet.

**Tab. 16: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Messungen mit Scion.** Von links nach rechts sind aufgeführt: die verwendete DNA Sonde, deren chromosomale Lokalisation, die Markierung, die verwendete Suspension, die Messergebnisse der Pixel pro Fläche sowie der Fläche der Signale und die prozentualen Abweichungen.

DNA Sonde	Chromosom	Markierung	Suspension	Pixel			Fläche		
				Referenzsignal	2. Signal (Ø)	Abweichung [%]	Referenzsignal	2. Signal (Ø)	Abweichung [%]
LSI SYT	18q11.2	SO	Lymphozyten	100	83	17	100	85	15
		SG	Lymphozyten	100	75	25	100	86	14
		SO	Knochenmark	100	80	20	100	79	21
		SG	Knochenmark	100	82	18	100	85	15
		SO	Fall N	100	85	15	100	87	13
		SG	Fall N	100	85	15	100	86	14
RP11-2F9	15q11.2	SG	Fall N	100	83	17	100	83	17
RP11-138C5	15q11.2	SO	Fall N	100	83	17	100	89	11



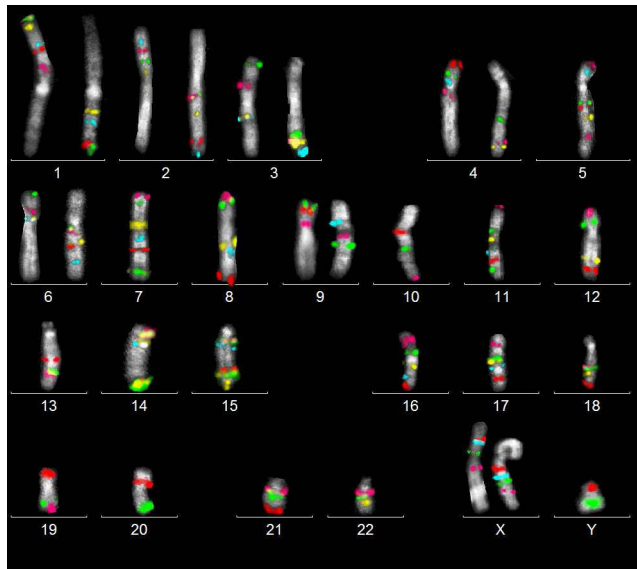
**Abb. 8: Messergebnisse der LSI SYT Sonde auf Fall N.** Vergleichend dargestellt sind die Messergebnisse der Pixel pro Fläche sowie der Fläche der Signale. Die Abbildung zeigt, dass die Signale in ihrer Größe um maximal 30 % abweichen.

Anhand der Ergebnisse der Experimente wurde festgelegt, dass ein Signalunterschied protokolliert wird, wenn das kleinere Signal weniger als 70 % der Größe des anderen Signals hat bzw. die Abweichung größer als 30 % ist.

### 3.3.1.5 Zusammenstellung chromosomenspezifischer SONDENSSETS

Die BAC-Klone aus den CNV-Regionen wurden für pod-FISH zu chromosomenspezifischen SONDENSSETS zusammengestellt. Diese SONDENSSETS boten den Vorteil, dass in nur einem Hybridisierungsschritt mehrere BACs gleichzeitig eingesetzt werden konnten. Pro Chromosom wurden maximal fünf BAC-Klone miteinander kombiniert und mit fünf verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert. Eine Doppelmarkierung der BAC-Klone wurde vermieden, da diese bei der Aufnahme mit ISIS konkurrieren und so die Qualität der Signalintensitäten beeinträchtigt werden könnten. Für die größeren Chromosomen 1, 2, 3, 4, 6, 9 und X wurden zwei verschiedene Sets zusammengestellt: ein SONDENSSET für den p-Arm und ein SONDENSSET für den q-Arm. Die verschiedenen SONDENSSETS sind in Abb. 9 dargestellt.





**Abb. 9: Übersicht der pod-FISH Sets für alle 24 menschlichen Chromosomen.** Die Abbildung zeigt jeweils eines der beiden homologen Chromosomen. Die Signale auf den Chromosomen entsprechen einer Pseudofarben-darstellung der BAC Signale. Für jedes Chromosom wurden in Abhängigkeit von dessen Größe drei bis fünf BACs ausgewählt und zu einem Sondenset kombiniert.

### 3.3.2 Validierung der pod-FISH Methode

Die Validierung der Methode wurde an verschiedenen Fällen durchgeführt.

#### 3.3.2.1 Klinisch unauffällige Fälle

Es wurden fünf Lymphozytensuspensionen von klinisch unauffälligen Probanden ausgewählt. Davon waren drei Suspensionen von männlichen und zwei von weiblichen Probanden. Weiterhin wurden die Chromosomen 7, 8 und 11 ausgewählt, da diese bei der AML häufig in Aberrationen involviert sind. Für jedes Chromosom wurden vier bis fünf BACs ausgewählt, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zu einem Sondenset kombiniert. Die Hybridisierung dieses Sondensets auf die OT der jeweiligen Suspension wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Auswertung der Signale zeigte neben gleichen Signalstärken auch Signalunterschiede in den BAC-Klonen. Die informativen BAC-Klone variierten zwischen den jeweiligen Suspensionen (siehe Tab. 17).

**Tab. 17: Zusammenfassende Darstellung der Hybridisierungsergebnisse der BAC-Klone der Chromosomen 7, 8 und 11 auf Testsuspensionen.** Von links nach rechts aufgeführt sind der Name des BAC-Klons, dessen zytogenetische Lage und Markierung, sowie die Ergebnisse der Hybridisierungen der Suspensionen (S) I bis V, "-" bedeutet gleiche Signalstärke, "+" bedeutet Signalunterschied.

BAC Klon	Chromosom	Markierung	S I	S II	S III	S IV	S V
RP11-79G16	7p21.1	SG	+	+	+	+	+
RP11-316L18	7p21.1	SO	-	-	-	+	+
RP11-90N9	7q21.1	SG	-	+	+	-	-
RP11-89O20	7q31.1	SO	-	-	-	-	-
RP11-669B10	7q35	SG	+	+	+	+	-
RP11-90I3	8p22	SG	-	-	-	+	+
RP11-96G1	8p21.1	SO	-	+	+	-	-
RP11-959D4	8q22.2	SG	-	-	-	-	-
RP11-21H16	8q24.22	SO	-	-	-	+	-
RP11-79A4	11p11.2	SG	+	+	-	-	+
RP11-49D19	11q12.3	SO	-		+	-	-
RP11-19P3	11q14.1	SG	+	+	+	-	+
RP11-33F6	11q22.2	SO	-	+	-	-	-
RP11-356E17	11q23.3	SG	-	-	-	-	-

### 3.3.2.2 Fälle mit Polymorphismen im Heterochromatin

Homologe Chromosomen von klinisch unauffälligen Probanden können optisch nicht voneinander unterschieden werden. Eine Ausnahme bilden die mikroskopisch sichtbaren strukturellen Varianten im menschlichen Genom, die als Heteromorphismen bezeichnet werden (siehe 1.5). Trägt der Proband in einem seiner Chromosomen einen Heteromorphismus, lassen sich die homologen Chromosomen zytogenetisch in der GTG-Bänderung unterscheiden.

Es wurden fünf Fälle mit jeweils einem Polymorphismus im Heterochromatin des Chromosoms 1 bzw. 16 ausgewählt. Hierbei handelte es sich jeweils um eine Veränderung des zentromernahen Heterochromatins, das auf einem Chromosom deutlich vergrößert in der GTG-Bänderung erschien. Da die Bänderung der DAPI-Färbung nach der FISH in etwa der GTG-Bänderung entspricht, konnten die homologen Chromosomen anhand des Polymorphismus unterschieden werden.

Für Chromosom 1 wurden elf BAC-Klone ausgewählt und in fünf verschiedenen Farben markiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung auf drei Suspensionen. Die Ergebnisse sind in Tab. 18 zusammengefasst.

Bei Fall 1 konnten Signalunterschiede in drei verschiedenen BAC-Klonen (RP11-163M9, RP11-259N12 und RP11-415M14) beschrieben werden. Dabei wurde festgestellt, dass die unterschiedlichen Signalgrößen jeweils dem gleichen Chromosom zugeordnet werden konnten. So hatte beispielsweise der BAC-Klon RP11-259D12 schwache Signale auf dem zytogenetisch unauffälligen Chromosom 1 und starke Signale auf dem Chromosom mit dem Polymorphismus. Dies konnte in mehr als 70 % der Metaphasen beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Auswertung der beiden anderen Fälle. Bei Fall 2 wurden Signalunterschiede in drei BAC-Klonen und bei Fall 3 in einem BAC-Klon nachgewiesen.

**Tab. 18: Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse der BAC-Klone des Chromosom 1 auf Suspensionen dreier Fälle mit Polymorphismen im Chromosom 1.** Von links nach rechts aufgeführt sind: der BAC-Klon, dessen zytogenetische Lage und Markierung sowie die Hybridisierungsergebnisse der Fälle 1 bis 3. Die Chromosomen werden bezeichnet als "# 1" für das zytogenetisch unauffällige Chromosom 1 und "# 1qh+" für das Chromosom 1 mit dem Polymorphismus. Wiesen die Signale der jeweiligen BAC Klone zwischen den homologen Chromosomen keine Unterschiede auf, wurde dies mit "1" protokolliert. Zeigten sich Signalunterschiede, wurde das kleinere Signal mit "0,5" und das größere Signal mit "1,5" bezeichnet.

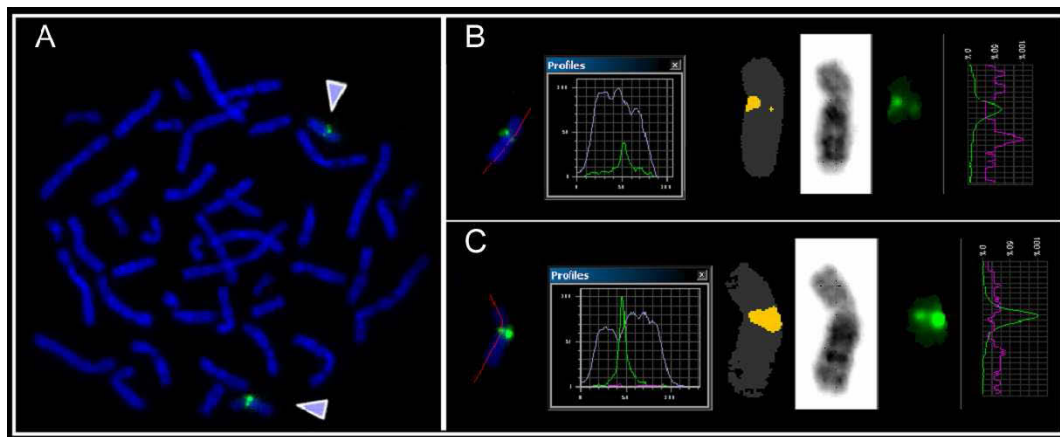
BAC-Klon	Chromosom	Markierung	Fall 1		Fall 2		Fall 3	
			# 1	# 1qh+	# 1	# 1qh+	# 1	# 1qh+
RP11-430E19	1p36.33	TR	1	1	1	1	1,5	0,5
RP11-283E3	1p36.33	SG	1	1	1	1	1	1
RP1-163M9	1p36.13	Cy5	0,5	1,5	1	1	1	1
RP6-65F20	1p32.2	DEAC	1	1	0,5	1,5	1	1
RP11-131O15	1p31.2	SO	1	1	1	1	1	1
RP11-259N12	1p21.1	TR	0,5	1,5	1	1	1	1
RP11-458D21	1q21.1	SG	1	1	1	1	1	1
RP11-415M14	1q25.2	Cy5	1,5	0	1,5	0,5	1	1
RP11-109P13	1q31	DEAC	1	1	1	1	1	1
RP11-1016N21	1q42.2	SO	1	1	1,5	0,5	1	1
RP11-438F14	1q44	SG	1	1	1	1	1	1

Für das Chromosom 16 standen fünf BAC-Klone zur Verfügung, die in fünf verschiedenen Farben markiert und auf zwei Suspensionen mit Polymorphismen im Chromosom 16 hybridisiert wurden (Ergebnisse siehe Tab. 19).

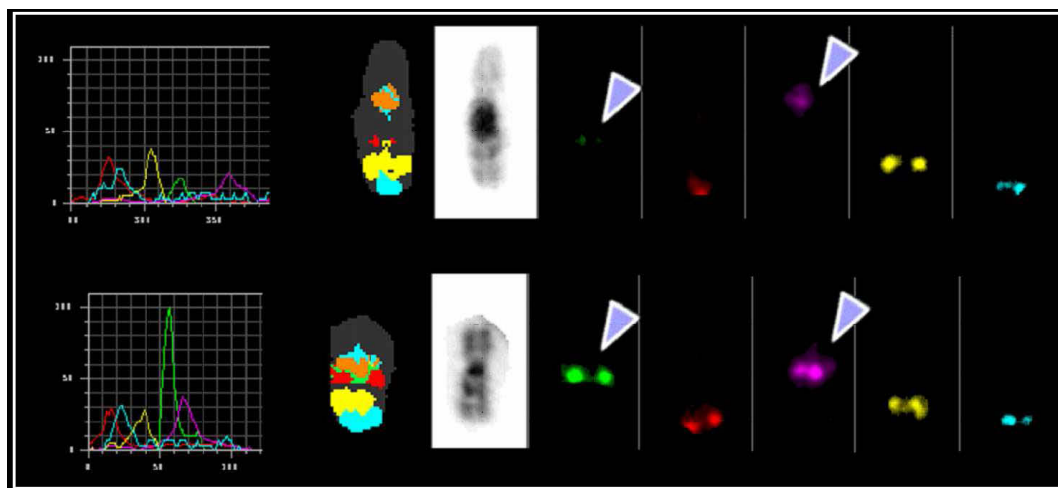
Bei Fall 1 wurde in zwei BAC-Klonen, RP11-488I20 und RP11-419B13, ein Signalunterschied detektiert, die anderen drei BAC-Klone wiesen die gleiche Signalstärke auf. Das größere Signal konnte jeweils in mehr als 70 % der Metaphasen dem zytogenetisch unauffälligen Chromosom zugeordnet werden. In den Abbildungen 10 und 11 sind die Ergebnisse der Hybridisierung des BACs RP11-488I20 sowie des Sondensets für Chromosom 16 dargestellt. Bei Fall 2 wurde kein Signalunterschied nachgewiesen. Somit ist auch keine Aussage über die Zuordnung der Signalstärke zu dem jeweiligen homologen Chromosom möglich.

**Tab. 19: Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse der BACs vom Chromosom 16 auf Suspensionen zweier Fälle mit Polymorphismen im Chromosom 16.** Die Ergebnisdarstellung ist die Gleiche wie Tab.18.

BAC-Klon	Chromosom	Markierung	Fall 1		Fall 2	
			# 16	# 16qh+	# 16	# 16qh+
RP11-488I20	16p11.2	TR	1,5	0,5	1	1
RP11-419B13	16q12.1	SG	1	1	1	1
RP11-142E6	16q22	Cy5	1	1	1	1
RP11-443M9	16q24	DEAC	1	1	1	1
RP11-191P24	16q24.3	SO	1	1	1	1



**Abb. 10: Ergebnisse der Hybridisierung des BAC-Klons RP11-488I20 in 16p11.2 auf Material des Falls 1 mit einem Polymorphismus im Chromosom 16.** Der BAC-Klon wurde mit SG markiert. Bild A zeigt das BAC-Signal in der Metaphase. Die Bilder B und C stellen die beiden homologen Chromosomen 16 dar. Die unterschiedliche Signalstärke ist visuell bzw. anhand der Fluoreszenzprofile sichtbar.

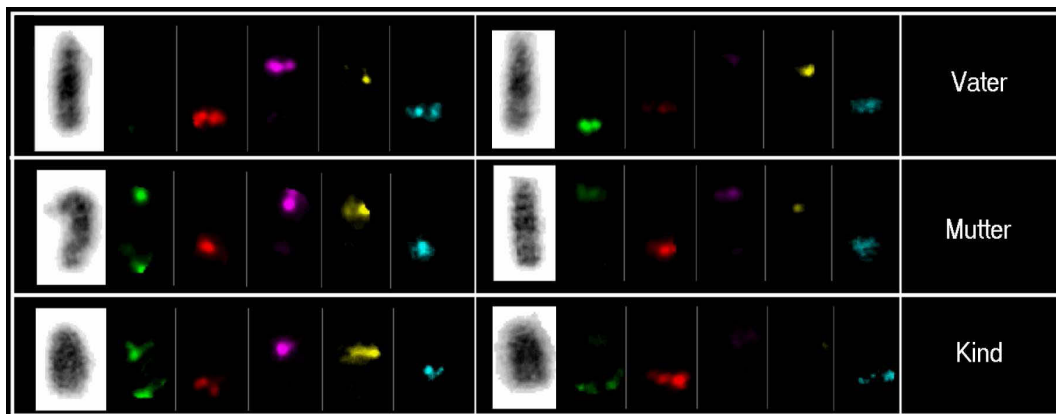


**Abb. 11: Ergebnisse der Hybridisierung des pod-FISH Sets für Chromosom 16 auf Material des Falls 1 mit einem Polymorphismus im Chromosom 16.** Die fünf verwendeten BAC-Klone wurden mit fünf verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Von links nach rechts dargestellt sind die Fluoreszenzprofile und die Pseudofarbendarstellung der BAC-Signale, das invertierte DAPI und die einzelnen BAC-Signale in den jeweiligen Fluoreszenzfarben. Die Pfeile zeigen die Unterschiede in den Signalstärken.

### 3.3.2.3 UPD-Fälle

Der erste der beiden untersuchten UPD-Fälle wies eine maternale Heterodisomie des Chromosoms 15 auf. Für die Hybridisierung wurden sechs BAC-Klone

ausgewählt und in fünf verschiedenen Fluoreszenzfarben markiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 12 dargestellt. Vergleicht man die Signalstärken der BACs zwischen Mutter und Kind ist erkennbar, dass beide die gleiche Signalkonstellation besitzen. Dies wird vor allem in den Signalen der BAC-Klone, die in SG markiert sind, deutlich. Die BAC-Signale beim Vater zeigten eine andere Signalkonstellation. Diese Ergebnisse bestätigten eine maternale Heterodisomie, wie sie bereits mit Mikrosatelliten nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 12: Hybridisierungsergebnisse der BACs vom Chromosom 15 auf Material des Falls 1, der eine maternale Heterodisomie des Chromosoms 15 beschrieb.** Dargestellt sind die beiden homologen Chromosomen 15 von Vater, Mutter und Kind. Sechs BACs wurden jeweils hybridisiert, davon waren zwei BACs in SG markiert, die anderen in SO, TR, Cy5 und DEAC. Es ist deutlich zu erkennen, dass die BACs, hybridisiert auf den Chromosomen der Mutter und des Kindes, die gleiche Signalkonstellation aufweisen.

Bei Fall 2 handelte es sich um eine maternale Heterodisomie des Chromosoms 14. Die Chromosomenpräparation erfolgte nicht aus Heparin- sondern aus Citratblut. Dies hatte den Nachteil, dass wenige Metaphasen für die FISH verfügbar waren und nur eine Hybridisierung mit fünf BACs durchgeführt werden konnte. Die Ergebnisse sind in Abb. 29 im Anhang dargestellt. Keiner der verwendeten BACs wies Signalunterschiede zwischen den homologen Chromosomen auf. Die Signalstärken waren bei Vater, Mutter und Kind jeweils gleich.

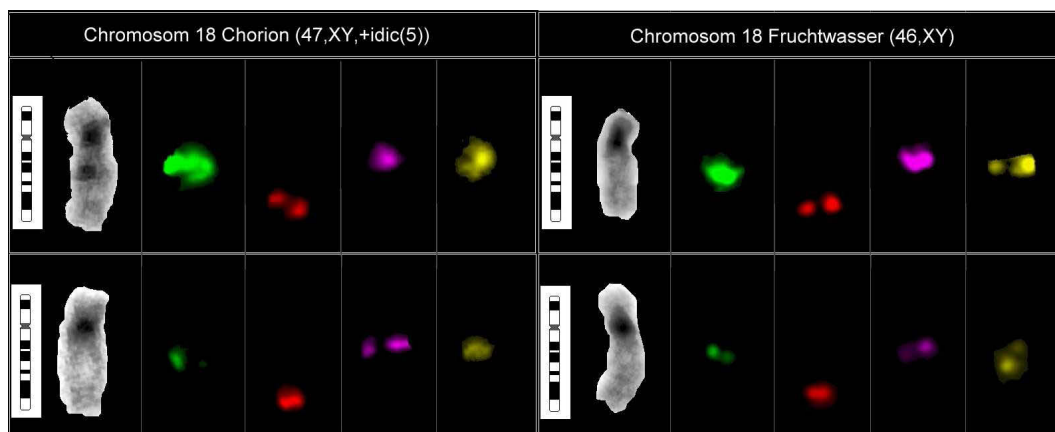
#### 3.3.2.4 Fall mit Verdacht auf Zwillingschwangerschaft

Die zytogenetische Analyse dieses Falls zeigte im Fruchtwasser einen normalen Karyotyp, aber im Chorion ein zusätzliches Markerchromosom 5. Auf Grund dieser zwei Klone bestand der Verdacht einer Zwillingschwangerschaft. Als Ausgangsmaterial für FISH standen jeweils nur zwei OT Chorionmaterial und Fruchtwasser zur Verfügung. Es wurden BACs der Chromosomen 15 und 18 hybridisiert. Für das Chromosom 15 wurden sechs verschiedene und für das Chromosom 18 vier verschiedene BACs hybridisiert (Ergebnisse siehe Tab. 20). In Abb. 13 sind die BAC-Signale im Chromosom 18 dargestellt. Vier der BACs von den Chromosomen 15 und 18 zeigten Signalunterschiede innerhalb der homologen

Chromosomen. Leider waren diese Unterschiede sowohl im Fruchtwasser als auch im Chorion sichtbar. Folglich können diese Signalunterschiede nicht als Marker für eine mögliche Zwillingschwangerschaft gewertet werden.

**Tab. 20: Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse der BAC-Klone vom Chromosom 15 und 18 auf Fruchtwasser und Chorion.** Aufgeführt sind die verwendeten BAC-Klone, deren zytogenetische Lage und Markierung. Wurde bei der Auswertung ein Signalunterschied festgestellt, wurde der BAC-Klon als informativ beschrieben und mit “+“ gekennzeichnet. Keine Signalunterschiede wurden als nicht informativ (“-“) gewertet.

BAC Klon	Chromosom	Markierung	FW (46,XY)	Ch (47,XY,+idic(5))
RP11-2F9	15q11.2	TR	+	+
RP11-138C5	15q12	SG	-	-
RP11-194H7	15q14.1	Cy5	+	+
RP11-500O23	15q24.13	DEAC	-	-
RP11-91O13	15q25	SO	-	-
RP11-120N1	15q26	SG	+	+
RP11-89M10	18q12.3	TR	-	-
RP11-742D12	18q21	SG	+	+
RP11-160B24	18q21.2	Cy5	-	-
RP11-704G7	18q22	SO	-	-



**Abb. 13: Hybridisierungsergebnisse der BACs vom Chromosom 18 auf Chorion und Fruchtwasser.** Es sind jeweils dargestellt: das Ideogramm vom Chromosom 18, das invertierte DAPI der Chromosomen und die einzelnen Farbkanäle der BAC-Klone. Im Chorion wie auch im Fruchtwasser wurden die gleichen Signalstärken nachgewiesen.

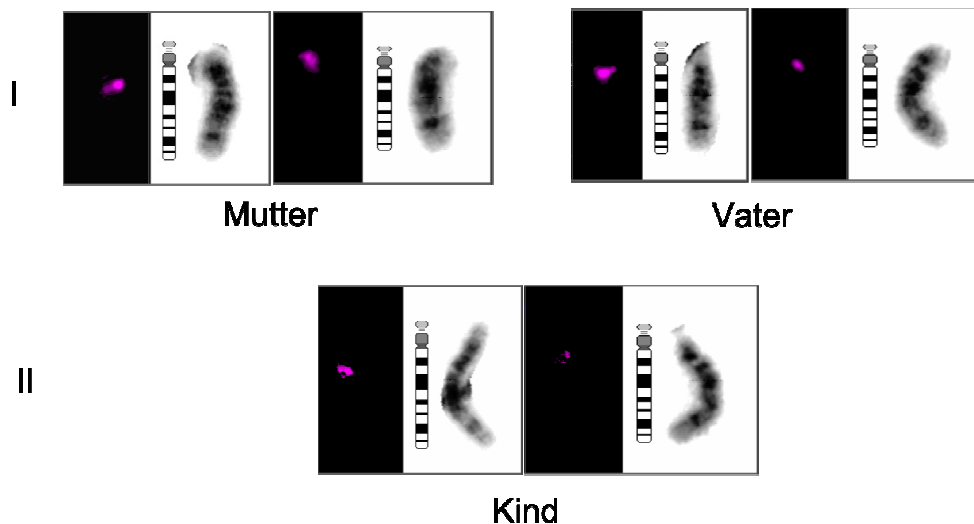
### 3.3.2.5 Fälle mit Chromosomenaberrationen

Im Rahmen der von der Verfasserin betreuten Diplomarbeit von Frau Sophie Hinreiner wurden die BAC-Klone an weiteren klinischen Fällen angewendet. Es wurden Suspensionen von zwölf Familien untersucht, in denen mindestens ein

Familienmitglied eine Chromosomenaberration aufwies. Das Ziel war die Bestimmung der elterlichen Herkunft der aberranten Chromosomen. Die Auflistung der Fälle ist in Tab. 48 im Anhang zu finden.

Zur Bearbeitung dieser Fälle wurden chromosomenspezifische SONDENSSETS zusammengestellt. Diese SONDENSSETS enthielten BACs, die keine Kreuzhybridisierung auf dem gleichen Chromosom aufwiesen und bei mehr als 10 % der Probanden der publizierten Studien nachgewiesen wurden. Die BACs wurden jeweils direkt mit einem von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Zusammenstellung der Sets ist in Tab. 49 im Anhang aufgeführt.

Die chromosomenspezifischen SONDENSSETS wurden auf die Suspensionen der einzelnen Familienmitglieder hybridisiert. In Tab. 48 im Anhang sind die Verwendung der jeweiligen Sonden und die Ergebnisse der Hybridisierungen aufgeführt. Insgesamt stand Material von zwölf Familien mit klinischen Auffälligkeiten zur Verfügung. Jedoch konnte nur bei einer Familie die Bestimmung der Herkunft des aberranten Chromosoms erfolgen (Fall 1). Dabei handelte es sich um eine Familie, in der Mutter und Tochter eine Robertsonsche Translokation zwischen den Chromosomen 14 und 21 aufwiesen. Der Vater war klinisch unauffällig. Der informative BAC war RP11-831B15 aus 14q11.2 (siehe Abb.14). Das Kind zeigte in dem aberranten Chromosom ein starkes Signal und in dem nicht aberranten Chromosom ein schwaches Signal. Da nur der Vater ebenfalls ein schwaches Signal in einem seiner homologen Chromosomen hatte, ließe sich daraus schließen, dass das nicht aberrante Chromosom des Kindes vom Vater vererbt wurde. Das aberrante Chromosom des Kindes und das der Mutter wiesen starke Signale auf und sind ein Hinweis dafür, dass die Mutter das aberrante Chromosom vererbt hat.



**Abb. 14: Hybridisierungsergebnisse des BACs RP11-831B15 auf die Chromosomen der Generationen I und II.** Der BAC-Klon aus 14q11.2 wurde in TR markiert. Dargestellt sind die homologen Chromosomen 14 von Mutter, Vater und Kind. Das linke der homologen Chromosomen bei Mutter und Kind ist das aberrante Chromosom. Anhand der Signalstärken ist erkennbar, dass das aberrante Chromosom möglicherweise von der Mutter vererbt und das nicht aberrante Chromosom mit dem schwachen Signal vom Vater vererbt wurde.

Weiterhin konnte bei Fall 7 ein Signalunterschied festgestellt werden. Die chromosomenspezifischen Sondenmixe und die informativen BACs wurden einzeln zur Bestätigung hybridisiert. Die Suspension des Vaters war bereits mehrere Jahre alt und die Qualität der Chromosomen und der Hybridisierung sehr schlecht. Daher konnte in diesem Fall keine Zuordnung der elterlichen Herkunft der homologen Chromosomen erfolgen.

#### 3.3.2.6 Etablierung eines gesamtgenomischen pod-FISH Sondensets

Die Etablierung und Anwendung des gesamtgenomischen pod-FISH Sondensets wurde ebenfalls im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Sophie Hinreiner durchgeführt.

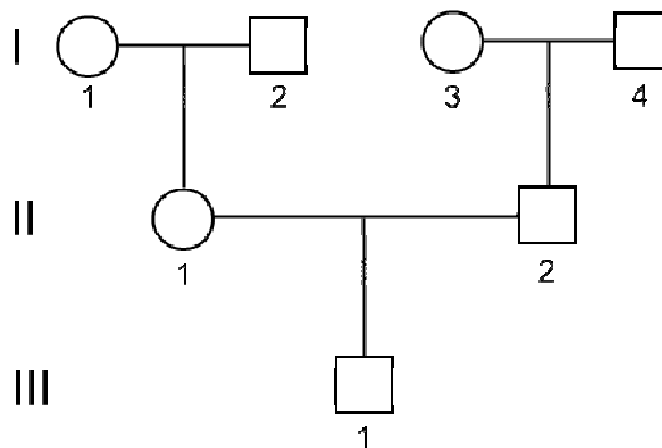
Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, wurden die BAC-Klone zu chromosomenspezifischen Sondensets zusammengestellt und erfolgreich auf mehreren Fällen angewendet. In einem weiteren Schritt wurden die BAC-Klone zu einem gesamtgenomischen Sondenset kombiniert. In dieses Sondenset integriert wurden BACs, die keine Kreuzhybridisierungen aufwiesen und mit einer Frequenz von mindestens 10 % bei den Probanden der publizierten Studien auftraten (siehe Tab. 50 im Anhang). Die 130 ausgewählten BACs wurden in vier Gruppen, gemäß den vier für die Markierung zu verwendenden Fluoreszenzfarbstoffen (TR, SO, SG und DEAC), eingeteilt.

Dieses Sondenset wurde zum Testen auf Material des Falls N hybridisiert (siehe 2.1). Dieser Fall umfasst neben einer männlichen Zelllinie mit 46,XY eine weitere Zelllinie (46,XX), die eine paternale Isodisomie aller 23 Chromosomen ist. Es wurden nur Metaphasen mit der Isodisomie, erkennbar an zwei X Chromosomen, ausgewertet. Die Ergebnisse der Signalstärken waren sehr variabel. Sie schwankten innerhalb eines BAC-Klons von schwachen bis zu starken Signalen. Ebenso variierten auch die Signalunterschiede, so dass der Wert für einen Unterschied von 70 % auf 50 % korrigiert werden musste.

#### 3.3.2.7 Anwendung des gesamtgenomischen pod-FISH Sondensets

Der gesamtgenomische Sondenmix wurde zur Untersuchung der Segregation der Chromosomen innerhalb einer Familie angewendet. Es standen Lymphozytensuspensionen von drei Generationen zur Verfügung. Der Stammbaum der Familie ist in Abb. 15 dargestellt. Alle Familienmitglieder waren zytogenetisch unauffällig. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie in Jena eine Mikrosatellitenanalyse durchgeführt. Die verwendeten Primer sind in Tab. 50 im Anhang aufgeführt. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese nach der Mikrosatelliten-PCR sind in den Abbildungen 30 und 31 ebenfalls im Anhang dargestellt. Für II-2 ergab sich ein informativer Bereich auf Chromosom 13 (13q22). Für II-1 wurden drei informative Bereiche nachgewiesen. Diese befanden sich auf Chromosom 3 (3p21), Chromosom 5 (5q23) und Chromosom 13 (13q22). Mit Hilfe dieser Analyse wurden die Eltern-Kind Verhältnisse bestätigt.





**Abb. 15: Stammbaum der Familie.** Die römischen Zahlen bezeichnen die Generation. Die Individuen werden mit arabischen Ziffern angegeben.

Der gesamtgenomische Sondenmix wurde auf die Suspensionen aller Familienmitglieder hybridisiert. Die Hybridisierungen wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Es wurde ein Familientrio ausgewertet. Da die BAC-Signale bezüglich ihrer Stärke sehr schwankten, konnte keine Aussage über die Segregation der Chromosomen getroffen werden. Außerdem erwies sich die Auswertung der Metaphasen als sehr langwierig. Aus diesen Gründen wurde eine erneute Hybridisierung mit chromosomenspezifischen Mixen durchgeführt. Diese hatten in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, dass sie hinsichtlich der Signalstärke homogenere Ergebnisse aufwiesen. Es wurden chromosomenspezifische Mixe für die Chromosomen 1-6 zusammengestellt (siehe Tab. 49 im Anhang) und auf die Suspensionen von II-1 und II-2 hybridisiert. Das Ziel war es, bei beiden Familienmitgliedern nach Signalunterschieden zu suchen, die dann Rückschlüsse auf die Signale bei den Eltern bzw. dem Kind zulassen. Vier der BACs zeigten sowohl bei der Hybridisierung in dem chromosomenspezifischen Set als auch in einer sich angeschlossenen Einzelhybridisierung Signalunterschiede. Bei einem der vier BACs (RP11-219A11) konnte eine Zuordnung zu den homologen Chromosomen der Familienmitglieder erfolgen und somit die Segregation über die Generationen nachgewiesen werden. Die Hybridisierungsergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt. Der BAC RP11-219A11 aus 3p21 zeigte bei II-1 einen Signalunterschied, d.h. es wurde ein starkes und ein schwaches Signal nachgewiesen. Die Eltern des Probanden zeigten ebenfalls Signalunterschiede, aber nicht innerhalb ihrer homologen Chromosomen. Die Mutter I-1 hatte zwei schwache Signale, der Vater I-2 wies zwei starke Signale auf, die jeweils die gleiche Signalstärke besaßen. Eine mögliche Schlussfolgerung hieraus könnte sein, dass die Mutter das Chromosom mit dem schwachen Signal, der Vater das Chromosom mit dem starken Signal vererbt hat. Die vorangegangene Mikrosatellitenanalyse bestätigte dieses Ergebnis, da ein informativer Bereich ebenfalls in 3p21 gefunden wurde (siehe Abb. 17).



### 3.3.2.8 Etablierung eines gesamtgenomischen pod-FISH Sondensets für Knochenmarksuspensionen

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, wurde bereits ein gesamtgenomisches pod-FISH Sondenset zusammengestellt. Dieses Sondenset setzte sich aus 130 BAC-Klonen zusammen und wurde auf Lymphozytensuspensionen getestet. Im Rahmen der Auswertung zeigten sich vielfältige Herausforderungen. Die Auswertung war auf Grund der hohen Anzahl der BAC-Klone sehr langwierig, teilweise war pro Tag nur die Auswertung einer Metaphase möglich. Zudem erwiesen sich die Signalstärken der BAC-Klone als sehr variabel. Aus diesen Gründen wurde beschlossen, für Knochenmarksuspensionen einen anderen gesamtgenomischen Mix zusammenzustellen. Zudem ist die Morphologie von Knochenmarkchromosomen sehr schlecht, d.h. das durchschnittliche Bandenstadium liegt bei 200-300 Banden pro haploiden Karyotyp und folglich sehr kurzen Chromosomen, auf denen eine Auswertung einer hohen Anzahl von BAC-Klonen sehr schwierig wäre. Für den gesamtgenomischen Mix für Knochenmarksuspensionen wurde die Frequenz der BACs auf 30 % erhöht, d.h. die BACs wurden in mindestens 30 % der Probanden der publizierten Studien nachgewiesen. Damit wurde die Anzahl der BACs auf 42 reduziert. Die BACs wurden in vier verschiedenen Farben markiert und in einem Sondenset kombiniert (siehe Tab. 52 im Anhang). Dieses Sondenset wurde auf mehreren Knochenmarksuspensionen getestet, u.a. auf Suspensionen von AML-Fällen mit zytogenetisch normalem Karyotyp. Die reduzierte Anzahl an BAC-Klonen bot den Vorteil einer schnelleren Auswertung. Allerdings schwankten auch hier die Signalstärken innerhalb der Metaphasen einer Hybridisierung sehr stark, so dass der Mix für weitere Untersuchungen nicht verwendet wurde.

### 3.3.3 Bestätigung von pod-FISH durch molekularbiologische Methoden

#### 3.3.3.1 Anwendung der RealTime-PCR

Die neu validierte Methode des pod-FISH sollte in einem weiteren Schritt durch eine andere, molekularbiologische Methode bestätigt werden. Folgende Idee lag hier zu Grunde: Es sollten Fälle mit pod-FISH BACs untersucht werden, bei denen die homologen Chromosomen beispielsweise anhand eines Polymorphismus zytogenetisch unterscheidbar wären. In diesen Fällen könnte nach BACs gesucht werden, die informativ wären, d.h. einen Polymorphismus in einer CNV-Region trügen, der immer einem der beiden homologen Chromosomen zuordenbar wäre. Dann könnten mit Mikrosezierung die homologen Chromosomen getrennt voneinander gesammelt werden und über eine RealTime-PCR der Polymorphismus in der DNA-Sequenz des Chromosoms nachgewiesen werden.

#### Fälle mit Polymorphismen

Es wurden 21 Fälle mit Polymorphismen im perizentrischen Heterochromatin des Chromosoms 16 ausgewählt. Anschließend wurde überprüft, wie deutlich zytogenetisch erkennbar der Polymorphismus ist, d.h. wie gut sich die Chromosomen

anhand dieser Veränderung unterscheiden lassen. Bei 7 der 21 Fälle zeigte sich ein schwacher Polymorphismus. Diese wurden aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Auf die verbleibenden 14 Fälle wurden BAC-Klone aus CNV-Regionen hybridisiert und nach informativen BACs gesucht. Es konnten mehrere informative BACs in verschiedenen Fällen beschrieben werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Für die sich anschließenden Untersuchungen wurde der Fall Nr. 7 ausgewählt, da in diesem Fall der Polymorphismus im Heterochromatin gut zytogenetisch erkennbar war und die Signalunterschiede in den informativen BAC-Klonen RP11-488I20 und RP11-77M7 aus 16p11.2 in den Auswertungen nach FISH ebenfalls sehr deutlich waren. Hierbei zeigte sich, dass die Chromosomen ohne den Polymorphismus die größeren BAC-Signale verglichen mit den Chromosomen mit dem Polymorphismus trugen.

#### Primer für die RealTime-PCR

Die informativen BAC-Klone RP11-488I20 und RP11-77M7 sind beide zytogenetisch in 16p11.2 lokalisiert. Da es sich bei dem BAC RP11-77M7 um einen BES-Klon handelt, ist laut Datenbank nur dessen Anfangs- und Endsequenz bekannt. Da für die Ermittlung der Primer für die RealTime-PCR die vollständige Sequenz bekannt sein muss, wurde dieser BAC aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Der andere BAC, RP11-488I20, ist vollständig sequenziert und befindet sich zwischen 34360 und 34490 kb (Abstand zum Telomer 16p). Folglich ist die BAC-Sequenz ca. 130 kb lang. Diese Sequenz wurde hinsichtlich Homologien auf dem gleichen oder anderen Chromosomen im Genom mit dem Repeatmasker kontrolliert, die jedoch nicht gefunden wurden. Da nicht bekannt ist, an welcher Stelle in der Sequenz sich der Polymorphismus befindet, wurden insgesamt elf Primerpaare mit dem Programm Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu>, Stand April 2008) ermittelt und von der Firma biomers.net bezogen (siehe Tab. 42 im Anhang). Die Primer lagen innerhalb der Sequenz etwa alle 10 kb und markierten jeweils einen Bereich von ca. 100 bp, der laut Protokoll des verwendeten Kits für die RealTime-PCR (Firma Qiagen) zwischen 100-150 bp Länge haben sollte. Bei der Ermittlung der Primer wurde darauf geachtet, dass diese eine möglichst ähnliche Schmelztemperatur besitzen und innerhalb ihrer Sequenz keine Homologien für Schleifenbildungen aufweisen. Zusätzlich wurde für die PCR ein interner Standard benötigt. Dafür wurde das *housekeeping* Gen *beta actin* gewählt, das auf Chromosom 7 lokalisiert ist, und aus dessen Sequenz sechs Primerpaare ermittelt (siehe Tab. 42 im Anhang). Die Primer innerhalb der polymorphen BAC-Sequenz sowie innerhalb der *beta actin* Sequenz wurden in einer Gradienten-PCR (siehe 2.3.2.7) hinsichtlich ihrer Annealingtemperatur optimiert und die Größe des amplifizierten Produkts in einer Gelelektrophorese kontrolliert (siehe 2.3.2.8).

#### RealTime-PCR

Die Anwendung der RealTime-PCR mit den ermittelten Primern wurde in einem Vorversuch getestet. Dazu wurde mikrosezierte DNA des Chromosoms 7 und 16 eines klinisch unauffälligen Probanden nach DOP-PCR verwendet. Die Auswertung

zeigte, dass die RealTime-PCR mit der mikrosezierten DNA und den Primern funktionierte und exakte sowie konstante Werte für jedes amplifizierte Produkt lieferte (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Schritt wurde eine Mikrosezierung mit der Lymphozytensuspension des Falls Nr. 7, der bei der Auswertung der BAC-Klone, den Polymorphismus zeigte, durchgeführt. Hierfür konnten jeweils fünf Chromosomen mit Polymorphismus und fünf Chromosomen ohne Polymorphismus gesammelt werden. Weiterhin wurden zwei zytogenetisch unauffällige Probanden ausgewählt und in deren Suspensionen jeweils fünf Chromosomen 7 für die Kontrolle der PCR gesammelt. Die mikrosezierten Proben wurden anschließend über eine DOP-PCR (siehe 2.3.2.1) amplifiziert. Anschließend wurde die RealTime-PCR, wie unter 2.3.2.9 beschrieben, durchgeführt. Die Auswertung zeigte, dass keine ausreichend messbare Amplifikation der Proben stattfand. Die messbaren Werte waren zu niedrig und schwankten stark.

### 3.3.3.2 Anwendung der SNP-Arrays

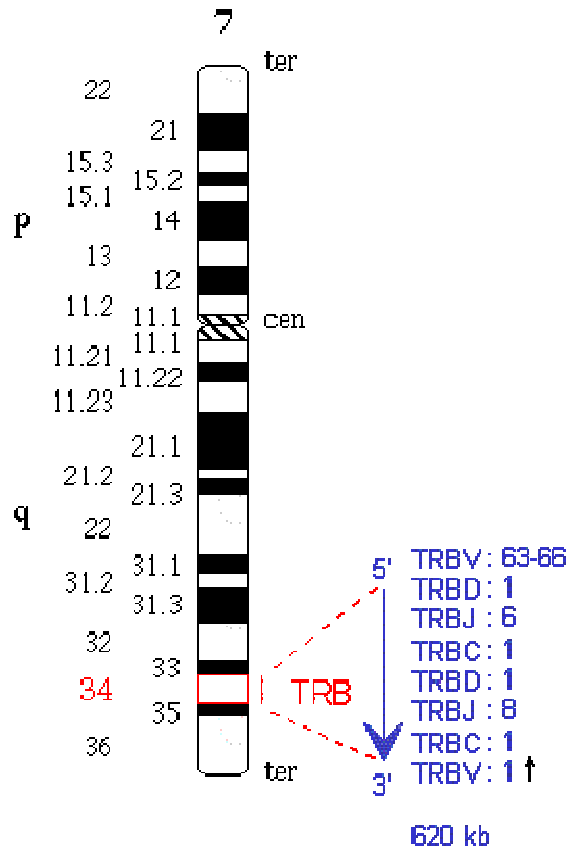
Im Rahmen eines weiteren Experiments bestand die Möglichkeit, die Ergebnisse von pod-FISH mittels SNP-Arrays zu bestätigen. Hierfür wurde der 500 K Array von Affymetrix verwendet und die Experimente freundlicherweise von Frau Diplom-Biologin Nicole Porsorski, Abteilung Tumorzytogenetik des Instituts für Humangenetik und Anthropologie, Jena durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden zwei Lymphozytensuspensionen mit bekannten Polymorphismen in CNV-Regionen ausgewählt. Die eine Suspension zeigte in der FISH-Auswertung einen Polymorphismus im Chromosom 19, in der anderen Suspension konnten mehrere polymorphe BACs in verschiedenen chromosomalen Regionen beschrieben werden. Die Isolierung der DNA für die SNP-Arrays erfolgte wie unter 2.3.4 beschrieben. Die sich nach den Experimenten anschließende Auswertung zeigte, dass in keinem der beiden Fälle die Polymorphismen mittels SNP-Arrays nachgewiesen werden konnten (siehe Abbildungen 32 und 33 im Anhang).

### 3.3.4 T-Zell Rezeptorgene

Während des Testens der BAC-Klone für pod-FISH auf Suspensionen klinisch unauffälliger Probanden (siehe 3.3.1), ist folgender Sachverhalt aufgefallen: Es waren zwei BAC-Klone im Test, RP11-1141E10 aus 7q34 und RP11-642H22 aus 14q11.2, die nur in 50 % der analysierten Metaphasen zwei Signale zeigten. In den anderen 50 % der Metaphasen war nur ein Signal auf einem der beiden homologen Chromosomen vorhanden.

Der BAC RP11-1141E10 aus 7q34 hat eine Größe von 163 kb und liegt zwischen 141.923 kb und 142.086 kb (Abstand vom Telomer 7p). Er befindet sich in der Region des T-Zell Rezeptorlokus Beta, der eine Größe von 620 kb hat (siehe Abb. 18). Dieser Locus besteht aus 82 bis 85 Gensegmenten und codiert für Proteine der Beta-Kette des membrangebundenen T-Zell Rezeptors. Der zweite polymorphe BAC, RP11-642H22 aus 14q11.2, hat eine Größe von 179 kb. Seine Sequenz liegt zwischen 21.628 kb und 21.807 kb. In dieser Region auf Chromosom 14 liegt der Locus des T-Zell Rezeptors Alpha, dessen Gene für Proteine der Alpha-Kette des T-

Zell Rezeptors codieren. Beide T-Zell Rezeptor Loci sind komplex aufgebaut und werden während der Zellentwicklung durch somatische Rekombinationen rearrangiert.



**Abb. 18: Darstellung des menschlichen T-Zell Rezeptorlokus Beta in 7q34 (<http://imgt.cines.fr>, Stand April 2008).** Die rote Linie verweist auf den Lokus, der sich im langen Arm des Chromosoms 7, in 7q34, befindetet. Der blaue Pfeil zeigt die 5'→3' Orientierung und die Reihenfolge der Gensegmente an. Der Lokus ist 620 kb groß und enthält ca. 82-85 Gensegmente.

Zur Bestätigung der vorangegangenen Ergebnisse wurden beide BAC-Klone auf vier weitere Suspensionen klinisch unauffälliger Probanden hybridisiert. Erneut wurde in der Hälfte der Metaphasen nur ein Signal auf einem der beiden homologen Chromosomen nachgewiesen.

Anschließend wurde der BAC vom Chromosom 7, RP11-1141E10, auf den Fall N hybridisiert. Die Analyse der normalen Zelllinie mit 46,XY zeigte erneut Metaphasen mit nur einem Signal neben Metaphasen mit zwei Signalen. Die Analyse der isodisomen Zelllinie war etwas komplexer. Hierzu wurden insgesamt 26 Metaphasen ausgewertet. In fünf Metaphasen konnten zwei Signale nachgewiesen werden, in 14 Metaphasen nur ein Signal und in sieben Metaphasen wurde kein Signal detektiert. In diesen Metaphasen ohne Signal konnte eine Kontrolle der Hybridisierung auf Grund der Kreuzhybridisierung des BACs im Zentromerbereich von Chromosom 9 erfolgen. Diese Kreuzhybridisierung war in allen Metaphasen ohne Signal im Chromosom 7 auf den Chromosomen 9 sichtbar.

Anhand dieser Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass ein Bereich unbestimmter Größe auf dem Chromosom 7 ohne Signal deletiert ist. Diese Deletion sollte näher eingegrenzt werden. Dafür wurden weitere BAC-Klone, die in den Bereichen der T-Zell Rezeptorloci 7 und 14 lagen bzw. proximal oder distal flankierten, bestellt. Die

BAC-Klone sind in Tab. 21 zusammengefasst. Die Lage der BAC-Klone bezüglich der T-Zell Rezeptorloci ist in den Abbildungen 19 und 20 grafisch dargestellt.

**Tab. 21: Zusammenfassung der BAC-Klone für die T Zell Rezeptorloci.** Von links nach rechts aufgelistet sind die zytogenetische Lage des BACs und sein Name, der Datenbankcode (AC), die Größe, die Signalstärke nach FISH und eventuell vorhandene Kreuzhybridisierungen.

Chromosom	Bande	BAC	AC	Start [kb]	Ende [kb]	Signalstärke	Kreuzhybridisierung
7	q34	RP11-786A19	AQ454957	141.367	141.547	sehr gut	-
7	q34	RP11-612F12	AQ360935	141.392	141.594	-	Cen5;6p23;11q23;13q14;14q21;15q21;Cen18;Cen19
7	q34	RP11-1141E10	AQ699611	141.610	142.240	sehr gut	Cen9
7	q34	RP11-7P7	AZ520290	141.818	141.973	gut	Cen17
7	q34	RP11-157N15	AQ374231	142.143	142.323	gut	2p13;6q26;8p21; 18p11.3
7	q34	RP11-466C10	AQ635912	142.146	142.147	gut	9p13
14	q11.2	RP11-246A2	AQ491238	21.636	21.813	gut	-
14	q11.2	RP11-614K19	AQ361312	21.726	21.915	sehr gut	11q21;13q32;3q26
14	q11.2	RP11-1083M21	AQ743720	22.138	22.343	gut	-
14	q11.2	RP11-95A20	AQ313709	22.141	22.343	gut	-

Diese weiteren BAC-Klone wurden jeweils indirekt mit Biotin markiert und einzeln auf drei verschiedene Suspensionen klinisch unauffälliger Probanden hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper Streptavidin, an den FITC als grüner Fluoreszenzfarbstoff gebunden war. Die Ergebnisse der Hybridisierungen sind in Tab. 22 zusammengefasst. Alle fünf BAC-Klone auf Chromosom 7 zeigten Signale und konnten somit ausgewertet werden. Der BAC-Klon RP11-786A19 lag außerhalb des T-Zell Rezeptorlokus und wies in allen drei Suspensionen in 100 % der Metaphasen zwei Signale auf den Chromosomen 7 auf. Die BACs RP11-1141E10 (BAC-Klon in CNV-Region), RP11-7P7 und RP11-466C10 lagen mit ihrer Sequenz innerhalb des

Lokus. Diese BACs zeigten in ca. 50 % der Metaphasen zwei Signale und in den anderen 50 % ein Signal. Der letzte BAC Klon vom Chromosom 7, RP11-157N15, flankierte den Rezeptorlokus. Ca. 80 kb der BAC-Sequenz lagen innerhalb des Lokus, die restlichen 130 kb außerhalb. Bei diesem BAC-Klon konnten in allen Metaphasen zwei Signale nachgewiesen werden. Allerdings war in 50 % der Metaphasen ein deutlicher Signalunterschied zwischen den Signalstärken der beiden homologen Chromosomen sichtbar. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass auch hier eine Deletion vorhanden ist und sich das kleinere der beiden Signale auf dem Chromosom mit der Deletion befindet.

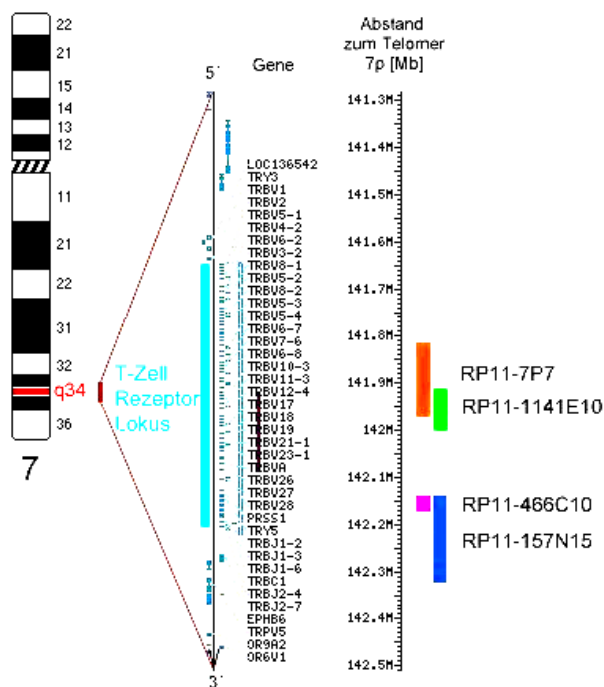
Für Chromosom 14 wurden vier BAC-Klone hybridisiert. Diese wurden jeweils indirekt mit Digoxigenin markiert und mit dem Antikörper Antidigoxigenin, an den Rhodamin als roter Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist, detektiert. Die beiden außerhalb des Lokus liegenden BAC-Klone RP11-1083M21 und RP11-95A20 zeigten in 100 % der Metaphasen zwei Signale. Der BAC RP11-246A2 lag innerhalb des Lokus und wies drei verschiedene Signalkonstellationen auf. In 50 % der Metaphasen wurden ein oder zwei Signale detektiert und in 50 % kein Signal. Der andere innerhalb des Lokus liegende BAC-Klon RP11-614K19, zeigte bei Suspension 1 in fast 100 % der Metaphasen kein Signal, bei den Suspensionen 2 und 3 waren es ca. 60 % der Metaphasen. In allen Metaphasen ohne Signale auf den Chromosomen 14 wurden die Kreuzhybridisierungen der BACs als Kontrolle für die erfolgreiche Hybridisierung gewertet.

**Tab. 22: Überblick der Hybridisierungsergebnisse der BAC-Klone auf drei Testsuspensionen.** Von links nach rechts ist zusammengefasst: das Chromosom, der Name des BAC-Klons, seine Lage bezüglich des T-Zell Rezeptorlokus, die Ergebnisse der Hybridisierung der Suspensionen S1, S2 und S3, d.h. die jeweilige Anzahl der Metaphasen mit einem, zwei bzw. keinem Signal auf den Chromosomen 7 bzw. 14.

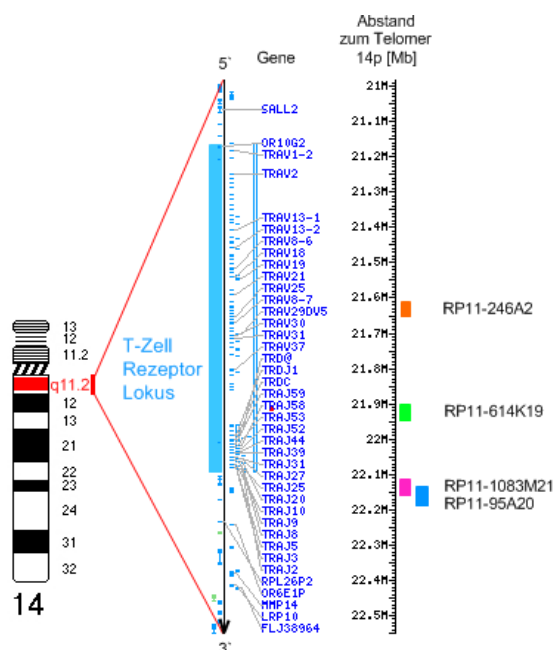
Chromosom	BAC	Lage zum Lokus	S1			S2			S3		
			2 Signale	1 Signale	kein Signal	2 Signale	1 Signale	kein Signal	2 Signale	1 Signale	kein Signal
7	RP11-786A19	außerhalb	15	0	0	12	0	0	12	0	0
7	RP11-1141E10	innerhalb	8	8	0	11	8	0	10	9	0
7	RP11-7P7	innerhalb	9	8	0	9	6	0	9	8	0
7	RP11-466C10	innerhalb	7	9	0	10	6	0	6	8	0
7	RP11-157N15	flankierend	17	0	0	14	0	0	19	0	0
14	RP11-246A2	innerhalb	3	6	9	5	2	6	4	6	10
14	RP11-614K19	innerhalb	0	1	11	1	5	10	2	4	5
14	RP11-1083M21	außerhalb	13	0	0	12	0	0	16	0	0
14	RP11-95A20	außerhalb	13	0	0	12	0	0	13	0	0

Für weitere Analysen wurden die BAC-Klone zu jeweils einem chromosomen-spezifischen Set kombiniert und in vier verschiedenen Farben markiert. Dies ermöglichte die gleichzeitige Hybridisierung aller BACs in nur einem Schritt und könnte eine Aussage über die Größe der Deletion zulassen. In den Abbildungen 19 und 20 sind die BACs und deren Markierung grafisch dargestellt.





**Abb. 19: Grafische Darstellung des T-Zell Rezeptorlokus Beta im Chromosom 7 und der Lage der verwendeten BAC-Klone.** Von links nach rechts sind dargestellt: das Ideogramm des Chromosoms 7, rot markiert ist die Bande 7q34, in der sich der T-Zell Rezeptorlokus befindet, daraus vergrößert der Bereich des Lokus in 5' → 3' Orientierung, bekannte Gene in diesem Bereich (TRB = T-Zell Rezeptor Beta Gen), der Abstand vom Telomer in Mb und die Lage sowie Fluoreszenzmarkierung der BACs.



**Abb. 20: Grafische Darstellung des T-Zell Rezeptorlokus Alpha im Chromosom 14 und der Lage der verwendeten BAC-Klone.** Von links nach rechts sind dargestellt: das Ideogramm des Chromosoms 14, rot markiert ist die Bande 14q11.2, in der sich der T-Zell Rezeptorlokus befindet, daraus vergrößert der Bereich des Lokus in 5' → 3' Orientierung, bekannte Gene in diesem Bereich (TRA = T Zell Rezeptor Alpha Gen), der Abstand vom Telomer in Mb und die Lage sowie Fluoreszenzmarkierung der BACs.

Das Sondenset für Chromosom 7 wurde erneut auf die vier Testsuspensionen hybridisiert. Es bestätigte sich das Ergebnis der Einzelhybridisierungen. Die Hälfte der Metaphasen wies für drei der vier BACs nur ein Signal auf. Dabei konnten auf

dem einen Chromosom 7 Signale aller drei BACs nachgewiesen werden und auf dem homologen Chromosom keine Signale. Nur der außerhalb des Rezeptorlokus liegende BAC-Klon RP11-157N15 zeigte auf beiden Chromosomen ein Signal.

In einem weiteren Experiment wurden lymphoblastoide Zelllinien verwendet. Dies sind B-Lymphozyten, die durch den Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert und immortalisiert wurden. Da es sich ausschließlich um B-Lymphozyten handelte, sollte keine Deletion im Chromosom 7 detektierbar sein. Von drei Probanden wurde je eine Zelllinie ausgewählt. Ebenfalls standen von diesen Probanden Lymphozytensuspensionen für die Untersuchungen zur Verfügung. Für die Hybridisierung wurde das Sondenset für das Chromosom 7 verwendet. Die vier darin enthaltenen BACs wurden wie in Abb. 19 dargestellt markiert. Die sich anschließende Auswertung zeigte, dass in allen drei Zelllinien immer zwei Signale sichtbar waren. Es wurden keine Metaphasen mit nur einem Signal oder keinem Signal auf einem der beiden homologen Chromosomen 7 nachgewiesen. Als Kontrolle dienten die Lymphozytensuspensionen der Probanden. Diese zeigten wie erwartet einen Mix aus Metaphasen mit einem und Metaphasen mit zwei Signalen. Das Verhältnis von einem zu zwei Signalen variierte zwischen den Probanden. Die prozentuale Häufigkeit von zwei Signalen schwankte zwischen 29 % und 48 %, dementsprechend die von einem Signal zwischen 52 % und 71 %.

Nachfolgend wurden weitere Experimente mit verschiedenen Untersuchungsmaterialien, die alle am Institut für Humangenetik und Anthropologie in Jena zur Verfügung standen, durchgeführt. Die BACs vom Chromosom 7 wurden auf zwei Fruchtwassersuspensionen hybridisiert. Im Fruchtwasser befinden sich größtenteils Hautfibroblasten, aber auch Zellen des Magen-Darm-Traktes und der Blase des Feten. Die Auswertung ergab, dass in allen Metaphasen zwei Signale sichtbar waren. Weiterhin wurde als Material Nabelschnurblut verwendet. Es standen Suspensionen von vier Patienten aus unterschiedlichen Schwangerschaftswochen (18-22) zur Verfügung. Die verwendeten BACs vom Chromosom 7 wurden markiert wie in Abb. 19 dargestellt. Zusätzlich wurde als Kontrolle ein zweiter Sondenmix hergestellt. In diesem wurden die BACs wie folgt markiert: RP11-7P7 TR, RP11-1141E10 DEAC, RP11-466C10 SG und RP11-157N15 SO. Beide Mixe wurden auf die Nabelschnurblutsuspensionen hybridisiert und analysiert (siehe Tab. 23). Die Auswertung zeigte eine unterschiedliche Anzahl an Deletionen. In etwa 32-44 % der Metaphasen konnte keine Deletion nachgewiesen werden, alle BAC-Signale waren sichtbar. Ebenso wurden in den Suspensionen in etwa einem Drittel der Metaphasen (ca. 32-44 %) eine kryptische Deletion aller drei BACs, die innerhalb der T-Zell Rezeptorregion lagen, beschrieben, wobei im Fall 4 diese Deletion nur in ca. 10 % der Metaphasen protokolliert wurde. Ebenso zeigten sich weitere Deletionen mit unterschiedlicher Häufigkeit. Es wurde beobachtet, dass nur zwei der drei BACs innerhalb der T-Zell Rezeptorregion deletiert waren. Dabei waren entweder RP11-1141E10 zusammen mit RP11-466C10 oder RP11-466C10 und RP11-7P7 deletiert. Auch konnte nachgewiesen werden, dass nur ein BAC deletiert war, wobei es sich jeweils um RP11-1141E10 oder RP11-466C10 handelte. Für RP11-7P7 wurde keine alleinige Deletion beobachtet.

**Tab. 23: Auswertung der Hybridisierung der BACs der T-Zell Rezeptorregion auf Nabelschnurblutsuspensionen.** Die Tabelle zeigt die Nr. des Falls und die dazugehörige Schwangerschaftswoche der Patientin, die Anzahl der insgesamt ausgewerteten MPP sowie die Anzahl der MPP mit den verschiedenen Deletionen.

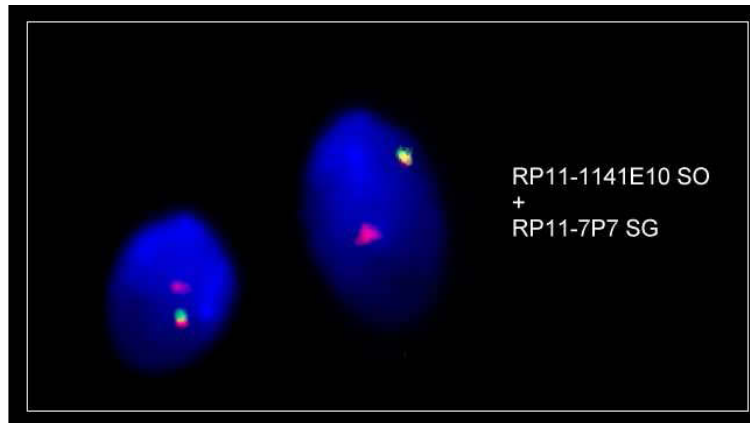
Fall	SSW	Anzahl MPP	keine Deletion	Deletion 3 BACs	Del RP11-1141E10+RP11-466C10	Del RP11-466C10+RP11-7P7	Del RP11-1141E10	Del RP11-466C10
1	18	22	8	7	6	0	1	0
2	22	18	8	8 (1xRP11-466 0/0)	4	2	1	1
3	20	19	6	8 (1xRP11-1141 0/0)	2	0	2	1
4	21	19	7	2	5	0	3	2

Zur Bestätigung, dass diese Rearrangierung des T-Zell Rezeptors ausschließlich im Thymus prozessiert wird, wurde ebenfalls eine Hybridisierung auf Knochenmarkproben durchgeführt. Hierfür wurden zwei Knochenmarkproben von Patienten mit einer AML bzw. einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) ausgewählt. Bei diesen Patienten wurde eine Knochenmarktransplantation mit einem Donor des anderen Geschlechts durchgeführt. Es standen Knochenmarkproben vom Zeitpunkt nach der Transplantation zur Verfügung. Auf Grund der Transplantation mit dem anderen Geschlecht war es möglich, anhand der Gonosomen die Metaphasen des gesunden Donors zu erkennen und zu analysieren. Es wurden die BACs der Chromosomen 7 und 14 hybridisiert. Auch hier konnten in allen Metaphasen auf beiden Chromosomen jeweils zwei Signale nachgewiesen werden.

Weiterhin wurden Knochenmarkproben von vier Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) untersucht. Bei zwei Patienten lautete die Diagnose B-ALL, die anderen zwei hatten eine T-ALL. Die Hybridisierung erfolgte mit den BACs der Chromosomen 7 und 14. Dabei konnten in allen vier Proben jeweils zwei Signale beobachtet werden. Im Rahmen der Untersuchung eines der beiden T-ALL Fälle war es möglich, die Lymphozytensuspension zu untersuchen. Es wurden ebenfalls die BACs der Chromosomen 7 und 14 hybridisiert. Auch hier wurden in allen ausgewerteten Metaphasen zwei Signale nachgewiesen. Weitere Lymphozytensuspensionen von Patienten mit T-ALL standen nicht zur Verfügung.

Ferner wurden die BAC-Klone auf Zelllinien von fünf verschiedenen Affen hybridisiert. Dabei handelte es sich um die den Menschen nächsten Verwandten, den Schimpansen und den Bonobo. Da es sich bei den Zelllinien um B-Lymphozyten handelt, waren auch hier immer zwei Signale detektierbar.

Ebenso wurde FISH an Spermien durchgeführt. Hierfür stand Spermien suspension eines klinisch unauffälligen Probanden zur Verfügung. Die Hybridisierung erfolgte mit BACs des Chromosoms 7. Bei der Auswertung der Spermien konnten immer ein Signal pro Spermium detektiert werden, so dass hier keine Deletion nachgewiesen wurde (siehe Abb. 21). Das eine Signal beruhte auf einen haploiden Karyotyp im Spermium.



**Abb. 21: Darstellung der BAC-Signale in Spermien.** Die BACs RP11-1141E10 (markiert in SO) und RP11-7P7 (markiert in SG) zeigen beide ein Signal auf Chromosom 7. Auf Grund der Nähe der BAC-Sequenzen auf dem Chromosom kommt es zu einer Überlagerung der Signale. Das zweite Signal in SO resultiert aus der Kreuzhybridisierung des BACs auf Chromosom 9.

Alle vorangegangenen Untersuchungen an T-Lymphozyten erfolgten an einem Gemisch verschiedener T-Lymphozyten. Deswegen wurde nach einer Methode zur Separation der verschiedenen T-Lymphozytensubtypen gesucht. Von der Firma Stem Cell Technologies wurde ein Kit verwendet, mit dem eine Isolierung von T-Zellen mit dem Oberflächenmarker CD4 aus peripherem Blut möglich ist ([http://www.stemcell.com/product\\_catalog/product\\_catalog\\_index.aspx?type=catalog\\_item&id=497](http://www.stemcell.com/product_catalog/product_catalog_index.aspx?type=catalog_item&id=497), Stand April 2008). Die Isolierung wurde von Frau Dr. Hasmik Mkrtchyan durchgeführt. Die isolierten CD4<sup>+</sup> Zellen wurden anschließend kultiviert und eine Chromosomenpräparation, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit BACs des Chromosoms 7. Bei der Auswertung zeigte sich, dass auch bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Hälfte der Zellen zwei Signale und die andere Hälfte nur ein Signal aufwies. Zusätzlich wurde vom selben Unternehmen ein Isolierungskit für CD8 positive T-Zellen bestellt. Eine Kultivierung dieser Zellen blieb erfolglos, so dass hier auf Grund der fehlenden Metaphasen keine FISH möglich war.

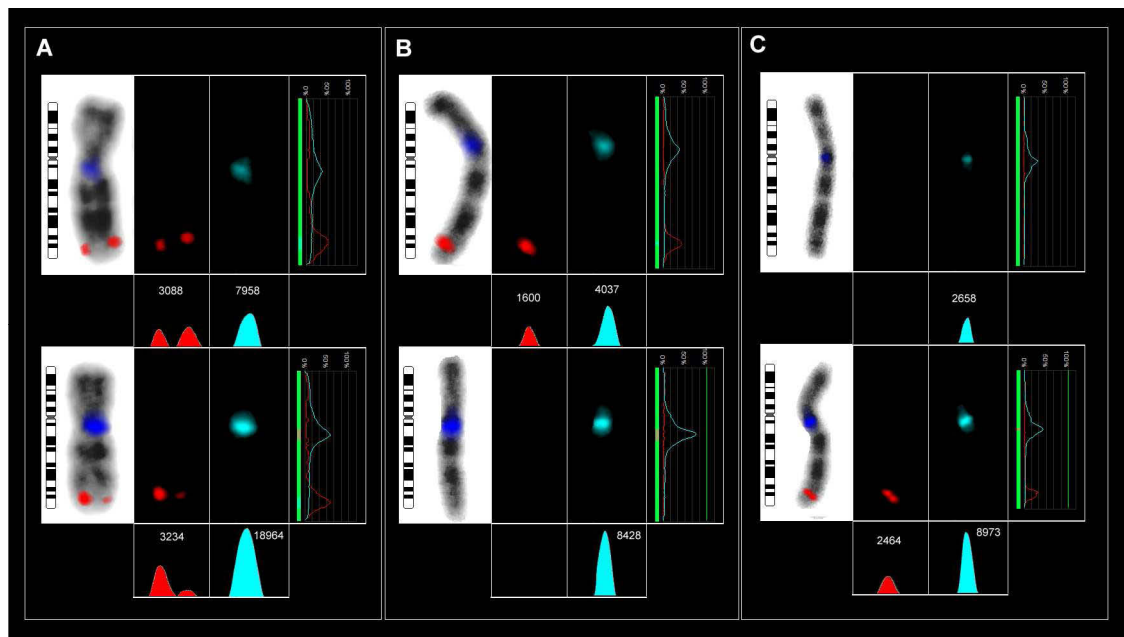
#### 3.3.4.1 Anwendung von pod-FISH

Wie im vorherigen Kapitel bereits beschrieben, wurde die kryptische Deletion im Chromosom 7 bei T-Lymphozyten mit Hilfe der BACs näher charakterisiert. Es zeigte sich, dass in mehr als 50 % der Metaphasen ein Bereich von mindestens 500 kb auf einem der beiden homologen Chromosomen deletiert war. In einem weiteren Experiment wurde nun erstmalig geklärt, ob diese Deletion immer auf dem gleichen homologen Chromosom 7 auftritt oder unabhängig auf beiden Chromosomen 7 zu finden ist. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die neue Methode pod-FISH eingesetzt. Unter Verwendung dieser Methode war es möglich, homologe Chromosomen auf Einzelzellniveau zu unterscheiden und so den Nachweis zu erbringen, welches Chromosom eine Deletion trägt.

Es wurden sechs verschiedene Suspensionen klinisch unauffälliger Probanden ausgewählt, die bereits vorher mit BACs, welche innerhalb der T-Zell Rezeptorregion liegen, auf die Häufigkeit der kryptischen Deletion in diesem Bereich untersucht wurden. Als Ergebnis wurden in allen Suspensionen mehr als 50 % der Metaphasen mit nur einem Signal nachgewiesen. Folgend wurden 18 verschiedene BACs aus CNV-Regionen ausgewählt und zu vier verschiedenen SONDENSETS zusammengestellt (siehe Tab. 53 im Anhang). In jedes SONDENSET wurde der BAC RP11-1141E10, der innerhalb der T-Zell Rezeptorregion lokalisiert ist, integriert. Das Ziel der anschließenden Hybridisierung auf die gewählten Suspensionen und der Auswertung der BACs bestand in der Suche nach einem polymorphen BAC, mit dem es möglich wäre, die Chromosomen 7 voneinander zu unterscheiden und so die Lage der Deletion bezüglich der homologen Chromosomen bestimmen zu können. Die Auswertung zeigte, dass in drei Suspensionen jeweils ein BAC als informativ beschrieben werden konnte (siehe Tabellen 54 und 55 im Anhang). In einer sich anschließenden Auswertung der Signale wurde protokolliert, auf welchem der Chromosomen sich bezüglich der Deletion in der T-Zell Rezeptorregion das stärkere Signal der polymorphen BACs befindet (siehe Tab. 24 sowie Abb. 34 im Anhang). Die Auswertung zeigte, dass in ca. 60 % der Metaphasen das stärkere der BAC-Signale auf dem Chromosom ohne Deletion nachgewiesen werden konnte. In den restlichen 40 % der Metaphasen war das stärkere Signal auf dem Chromosom mit Deletion. Zusätzlich wurde auf Suspension 5 eine weitere Hybridisierung durchgeführt. Bei dieser Suspension war durch vorangegangene Experimente bekannt, dass die MCB-Bank 7-3 polymorph ist (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass das Signal dieser DNA-Sonde Unterschiede in der Signalstärke zwischen beiden Chromosomen aufweist und somit eine Unterscheidung der homologen Chromosomen ermöglicht. Es erfolgte eine Hybridisierung dieser MCB-Sonde mit dem BAC RP11-1141E10 aus der T-Zell Rezeptorregion (siehe Tab. 24). Die Auswertung bestätigte das Ergebnis der vorangegangenen Experimente, auch hier war das stärkere Signal in ca. 56 % der Metaphasen auf dem Chromosom ohne Deletion und folglich in 44 % auf dem Chromosom, welches die Deletion trug (siehe Abb. 22).

**Tab. 24: Ergebnisse der Auswertung der polymorphen BACs bezüglich ihrer Lage auf den homologen Chromosomen.** Zusammengefasst sind für jede Suspension S und den informativen BAC-Klon jeweils die Anzahl der Metaphasen mit starkem Signal (1,5) bzw. schwachem Signal (0,5) sowie die prozentuale Verteilung auf den homologen Chromosomen 7 zusammengefasst.

RP11-1141E10	S1: RP11-188C21				S2: RP11-133K24				S4: RP11-188C21				S5: MCB 7-3			
	Anzahl MPP 1,5	[%]	Anzahl MPP 0,5	[%]	Anzahl MPP 1,5	[%]	Anzahl MPP 0,5	[%]	Anzahl MPP 1,5	[%]	Anzahl MPP 0,5	[%]	Anzahl MPP 1,5	[%]	Anzahl MPP 0,5	[%]
1,5	6	60	4	40	5	63	3	27	14	61	9	39	10	56	8	44
0	4	40	6	60	3	27	5	63	9	39	14	61	8	44	10	56



**Abb. 22: Übersicht der Hybridisierungsergebnisse von MCB 7-3 und RP11-1141E10 auf Suspension 5.** Die MCB-Bank 7-3 wurde in DEAC markiert, der BAC RP11-1141E10 aus der T-Zell Rezeptorregion in SO. Dargestellt sind in den Abbildungen A, B und C jeweils beide homologen Chromosomen 7 als Mischbild im invertierten DAPI mit den Signalen der FISH-Sonden und dem Ideogramm sowie die Signale in den einzelnen Farbkanälen und Fluoreszenzprofilen. Unter den einzelnen Farbkanälen ist sowohl graphisch als auch quantitativ die Auswertung der Signalstärke mit Scion abgebildet.

### 3.4 Anwendung von pod-FISH bei AML

#### 3.4.1 Nachweis segmentaler UPDs bei NK-AML und AML mit Trisomie 8

Zum Nachweis segmentaler UPDs bei AML wurde die neu entwickelte Methode des pod-FISH angewendet. Es sollte geprüft werden, ob sich anhand der Signalunterschiede die Homozygotisierung auf Grund der UPD nachweisen ließe. Hierfür wurden Knochenmarksuspensionen von drei NK-Fällen und vier AML-Fällen mit Trisomie 8 ausgewählt. Anschließend wurden Sondensets für die Chromosomen 8, 11 und 13 zusammengestellt und hybridisiert (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung der Signale zeigte, dass bei NK-AML die meisten BACs nicht informativ waren. Die BAC-Signale waren in praktisch allen Metaphasen gleich. Zeigte sich ein Signalunterschied, dann wurde dieser in einer unterschiedlichen Anzahl an Metaphasen beschrieben, so dass hier kein sicherer Rückschluss auf die Anzahl der Blasten gezogen werden konnte. Bei AML mit Trisomie 8 zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Bei den meisten BACs war kein eindeutiger Signalunterschied, der in allen Zellen nachweisbar war, erkennbar, d.h. sie waren nicht informativ. Wurde ein informativer BAC protokolliert, dann zeigte dieser Signalunterschiede sowohl in den trisomen als auch in den nicht trisomen Zellen.

### 3.4.2 Nachweis der Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 bei AML-Fällen mit Trisomie 8

Hierfür wurden 13 AML-Fälle mit Trisomie 8 als einzige Chromosomenaberration verwendet (siehe Tab. 25). In diesen Fällen wurde die Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 bestimmt. Dabei stellte sich die Frage, ob eines der Chromosomen 8 verdoppelt würde oder ein Chromosom während der Mitose verloren ginge und das andere dreifach vorläge. Dies entspräche einer uniparentalen Isodisomie.

Es wurden verschiedene pod-FISH SONDENSSETS für die Chromosomen 8 zusammengestellt. Die Zusammensetzung der Sets wird nachfolgend bei der jeweiligen Fallbeschreibung näher erläutert. Pro Fall wurden mindestens 15 MPP ausgewertet. Ein Signalunterschied wurde protokolliert, wenn die Abweichung beider Signale mehr als 50 % waren und der Signalunterschied in mindestens 2/3 der Metaphasen nachgewiesen wurde. Tab. 25 fasst die Daten der verwendeten Trisomie 8 Fälle und das jeweilige pod-FISH Ergebnis zusammen.

**Tab. 25: Zusammenfassung der Patientendaten mit AML Trisomie 8 und die jeweiligen pod-FISH Ergebnisse.** Von links nach rechts sind aufgelistet: die Fallnummer und Erstdiagnose (ED), das Geschlecht des Patienten und dessen Alter bei ED, der Karyotyp nach zytogenetischer Diagnostik und das Ergebnis der Hybridisierung nach pod-FISH. Ein "+" besagt, dass eine oder mehrere BACs informativ waren und die homologen Chromosomen 8 anhand ihrer Signalstärke voneinander unterschieden werden konnten. Ein "-" bedeutet, dass keine Signalunterschiede nachgewiesen werden konnten, die BACs also nicht informativ waren.

Fall	ED	Geschlecht	Alter bei ED	Karyotyp	Ergebnis pod FISH
1	AML-M1	weiblich	57	47,XX,+8 [7] / 46,XX [13]	+
2	AML aus MDS	weiblich	72	47,XX,+8 [3] / 46,XX [2]	+
3	AML aus MDS	weiblich	53	47,XX,+8 / 46,XX	+
4	AML aus MDS	männlich	56	kein Erstbefund	+
5	AML aus MDS	männlich	30	47,XX,+8 / 46,XX	+
6	AML aus MDS	männlich	69	47,XY,+8 [15] / 46,XY [6]	+
7	AML aus MDS	männlich	70	47,XY,+8 [2] / 46,XY [12]	+
8	AML	männlich	77	47,XY,+8	-
9	AML	weiblich	40	47,XX,+8 / 46,XX	-
10	AML-M2	weiblich	74	47,XX,+8	+
11	AML aus MDS	männlich	70	47,XY,+8	zu wenige MPP
12	AML	weiblich	12	47,XX,+8 / 46,XX	-
13	AML aus MDS	weiblich	62	47,XX,+8 / 46,XX	zu wenige MPP

Die ersten vier Fälle wurden im Rahmen der von der Verfasserin betreuten Diplomarbeit von Frau Vera Witthuhn bearbeitet.

Bei Fall 1 wurden vier BAC-Klone vom Chromosom 8 zu einem Mix kombiniert und hybridisiert (Ergebnisse siehe Tab. 26). Der BAC RP11-351I21 aus 8p23.1 erwies sich als informativ. Er zeigte in 12 von 17 Metaphasen sowohl in den trisomen als auch in den normalen Zellen Signalunterschiede. In den trisomen Zellen wurden jeweils zwei schwache und ein starkes Signal nachgewiesen. Da in den Zellen ohne

Trisomie 8 ebenfalls ein Signalunterschied auftrat, könnte daraus geschlussfolgert werden, dass das Chromosom 8 mit dem schwachen Signal verdoppelt vorlag. Die anderen BAC-Klone zeigten ein gemischtes Verhältnis an verschiedenen Signalkonstellationen und ließen keine klare Aussage zur Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 zu. Auffällig war der BAC RP11-459H21, der statt in 8p21.3 ein Signal in 8q21 zeigte. Dieses Signal wurde sowohl in den trisomen als auch in den nicht trisomen Zellen nachgewiesen.

**Tab. 26: Ergebnisse der Hybridisierung der BACs auf die Chromosomen des Falls 1.**

Von links nach rechts sind aufgelistet: die Fallnummer, die verwendeten BAC-Klone, deren zytogenetische Lage und Markierung, die Anzahl der Metaphasen mit den jeweiligen Signalstärken in Zellen mit Trisomie 8 und in Zellen ohne Trisomie 8. 1/1/1 bzw. 1/1 bedeutet gleiche Signalstärke zwischen den homologen Chromosomen. 1,5/1,5/0,5 wurde protokolliert, wenn zwei starke Signale und ein schwaches Signal sichtbar waren und 1,5/0,5/0,5, wenn ein starkes und zwei schwache Signale auf den Chromosomen 8 auftraten. Die Ergebnisse des informativen BACs sind rot markiert.

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/0,5	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/0,5
1	RP11-351I21	8p23.1	SG	1	4	12	1	15
	RP11-366J3	8p22	SO	5	3	9	11	5
	RP11-21H16	8q24.22	TR	3	4	10	9	7
	RP11-459H21	8p21.3	DEAC	Signal in 8q21			Signal in 8q21	

Auf Material des Falls 2 wurden drei verschiedene Mixe hybridisiert und ausgewertet (siehe Tab. 27). Zwei BAC-Klone, RP11-159F11 und RP11-513O17, erwiesen sich als informativ. Bei beiden BACs wurden in den trisomen Zellen zwei starke und ein schwaches Signal protokolliert. Die nicht trisomen Zellen zeigten hinsichtlich dieser beiden Klone ebenfalls einen Signalunterschied in den Chromosomen 8. Der BAC RP11-96G1 wies ebenfalls in beiden Zelllinien einen Signalunterschied auf. Jedoch zeigte er in den nicht trisomen Zellen nur auf einem Chromosom ein Signal. Der BAC stammt zytogenetisch aus 8q21.2 und ist ca. 60 kb groß. Es handelt sich um einen BES-Klon, dessen Sequenz sich zwischen 86.898 kb und 86.955 kb (Abstand zum Telomer 8p) befindet. In diesem Bereich sind gegenwärtig nur Pseudogene bekannt. Weiterhin auffällig war der BAC RP11-459H21, der statt in 8p21.3 ein Signal in 8q21 aufwies. Dieses Signal war sowohl in den trisomen als auch in den nicht trisomen Zellen vorhanden und wurde ebenfalls bei Fall Nr. 1 nachgewiesen.



Tab. 27: Ergebnisse der Hybridisierung im Fall 2.

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/05	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/05
1	RP11-351I21	8p23.1	SG	3	5	10	5	8
	RP11-366J3	8p22	SO	1	8	9	7	1
	RP11-21H16	8q24.22	TR	0	8	5	0	2
2	RP11-21H16	8p24.22	SO	9	5	3	5	2
	RP11-459H21	8p21.3	SG	Signal in 8q21			Signal in 8q21	
	RP11-159F11	8p23.3	TR	2	10	4	1	8
3	RP11-513O17	8q12.1	SO	1	5	2	1	8
	RP11-90I3	8p22	TR	0	2	4	1	8
	RP11-96G1	8q21.2	DEAC	0	3	4	0	6 (1,5/0)

Bei Fall 3 wurden für die Hybridisierung drei verschiedene Mixe vorbereitet (siehe Tab. 28). Die Auswertung zeigte, dass fünf BACs informativ waren. Alle fünf BACs zeigten in den trisomen und nicht trisomen Zellen Signalunterschiede und ermöglichten eine Unterscheidung der homologen Chromosomen. Eine Besonderheit wies der BAC RP11-21H16 auf. Er zeigte in den trisomen Zellen auf allen drei Chromosomen 8 Signale. Jedoch waren in den Zellen ohne Trisomie 8 nur Signale auf einem Chromosom nachweisbar. Bei diesem BAC-Klon aus 8q24.22 handelt es sich um einen BES-Klon, der eine Größe von ca. 200 kb hat. Er befindet sich zwischen 135.975 und 136.154 kb (Abstand zum Telomer 8p). In diesem Bereich ist gegenwärtig nur ein hypothetisches Gen bekannt, dessen Funktion noch nicht erforscht wurde.

Tab. 28: Ergebnisse der Hybridisierung im Fall 3.

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/05	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/05
1	RP11-1118M6	8p23.3	SG	4	8	3	10	8
	RP11-122L4	8p11.23	SO	0	2	13	2	16
	RP11-513O17	8q12.2	Cy5	5	7	3	11	7
	RP11-668K2	8q24.22	DEAC	7	5	3	15	2
2	RP11-351I21	8p23.1	SG	2	4	9	6	9
	RP11-366J3	8p22	SO	1	2	12	5	8
	RP11-21H16	8q24.22	TR	0	7	4	1	13 (1,5/0)
	RP11-459H21	8p21.3	DEAC	3	6	5	12	3
3	RP11-159F11	8p23.3	SG	2	5	7	3	8
	RP11-513O17	8q12.1	SO	0	5	7	3	10
	RP11-90I3	8p22	TR	3	7	4	5	8

Bei Fall 4 wurde ein Sondenset zusammengestellt und hybridisiert (siehe Tab. 29). In diesem Fall waren zwei BAC-Klone informativ gewesen. Diese zeigten sowohl in den trisomen als auch in den nicht trisomen Zellen jeweils unterschiedliche Signalstärken.

Tab. 29: Ergebnisse der Hybridisierung im Fall 4.

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/0,5	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/0,5
1	RP11-410N18	8p23.3	SG	8	0	1	4	0
	RP11-351I21	8p23.1	TR	2	3	9	1	3
	RP11-122L4	8p11.23	DEAC	2	7	1	0	4
	RP11-513O17	8q12.1	SO	9	3	1	3	0
	RP11-317J10	8q21.2	SG	14	0	0	4	0
	RP11-668K2	8q24.22	DEAC	14	1	0	4	0

Auf Material des Falls 5 wurden drei verschiedene Sondensets hybridisiert (siehe Tab. 30). Die Auswertung zeigte, dass drei BACs, RP11-668K2, RP11-351I21 und RP11-90I3, informativ waren. Alle drei BACs wiesen in den trisomen und nicht trisomen Zellen Signalunterschiede auf und ermöglichten eine Unterscheidung der homologen Chromosomen. Eine Besonderheit konnte bei zwei weiteren BACs festgestellt werden. Der BAC RP11-366J3 zeigte in sieben Metaphasen ohne Trisomie 8 nur ein Signal, in den trisomen Metaphasen jedoch immer drei Signale. Dieser BAC liegt zytogenetisch in der Bande 8p22 und hat eine Größe von ca. 50 kb. Es handelt sich um einen BES-Klon, dessen Anfang- und Endsequenzen bekannt sind. Der Abstand zum Telomer beträgt zwischen 14.670 und 15.719 kb. In diesem Bereich ist gegenwärtig nur ein Gen bekannt, das *Zeta-Sarcoglycan* Gen. Dieses Gen hat eine Größe von mehr als 465 kb und codiert für ein Transmembranprotein. Es gehört zu einem Komplex aus mehreren Proteinen und verbindet das innere Zytoskelett mit der äußeren Zellmatrix. Der zweite BAC, welcher eine Besonderheit aufwies, war RP11-21H16. Dieser BAC zeigte in neun trisomen Zellen Signale nur auf zwei der drei Chromosomen 8. Jedoch waren in den Zellen ohne Trisomie 8 immer zwei Signale nachweisbar. Diese kryptische Deletion wurde bereits im Fall 3 beschrieben, dort jedoch in den nicht trisomen Zellen.

Tab. 30: Ergebnisse der Hybridisierung im Fall 5.

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/0,5	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/0,5
1	RP11-1118M6	8p23.3	SG	19	3	1	5	1
	RP11-122L4	8p11.23	SO	4	11	7	4	2
	RP11-668K2	8q24.22	Cy5	1	3	9	0	3
	RP11-513O17	8q12.2	DEAC	14	7	2	6	0
2	RP11-351I21	8p23.1	SG	0	11	2	6	7
	RP11-366J3	8p22	SO	4	4	5	6	7 (1,5/0)
	RP11-21H16	8q24.22	TR	0	9 (1/1/0)	3	7	6
	RP11-459H21	8p21.3	DEAC	1	2	7	6	5
3	RP11-159F11	8p23.3	SG	1	4	7	3	4
	RP11-513O17	8q12.1	SO	2	5	6	2	7
	RP11-90I3	8p22	TR	1	3	8	1	6

Für Fall 6 wurden zwei Sondensets, die jeweils aus sechs BAC-Klonen kombiniert wurden, hergestellt. Die sich nach der Hybridisierung anschließende Auswertung

zeigte, dass vier der verwendeten BAC-Klone informativ waren (siehe Tab. 31). Sie wiesen in beiden Zelllinien Signalunterschiede auf.

**Tab. 31: Ergebnisse der Hybridisierung im Fall 6.**

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/05	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/05
1	RP11-774P7	8p23	TR	0	1	32	4	12
	RP11-594D21	8p23.1	SG	3	2	30	4	12
	RP11-115K10	8p21.2	DEAC	-	-	-	-	-
	RP11-803P16	8q11.21	SO	16	6	0	8	2
	RP11-430H18	8q12.1	SG	-	-	-	-	-
	RP11-96G1	8q21.2	DEAC	17	9	5	10	6
2	RP11-351I21	8p23.1	TR	5	14	5	2	5
	RP11-410N18	8p23.3	SG	-	-	-	-	-
	RP11-122L4	8p11.23	DEAC	1	15	5	2	5
	RP11-513O17	8q12.1	SO	20	3	0	5	2
	RP11-317J10	8q21.2	SG	11	8	3	4	2
	RP11-668K2	8q24.22	DEAC	18	2	5	6	0

Auf Material des Falls 7 wurden zwei Mixe hybridisiert und ausgewertet (siehe Tab. 32). Bei Mix 1 wurden nur die Zellen ohne Trisomie 8 ausgewertet. Da hier keiner der BACs informativ war, wurde die Auswertung der Trisomie 8 Zellen nicht durchgeführt. Im Mix 2 erwies sich ein BAC als informativ. Der BAC RP11-122L4 aus 8p11.23 zeigte sowohl in den trisomen Zellen als auch in den nicht trisomen Zellen eine kryptische Deletion jeweils auf einem der Chromosomen. Dieser BES-Klon hat eine Größe von ca. 600 kb. Innerhalb der BAC-Sequenz ist gegenwärtig ein Gen, *ADAM3A*, bekannt. Dieses Gen codiert für ein Protein, das am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt ist.

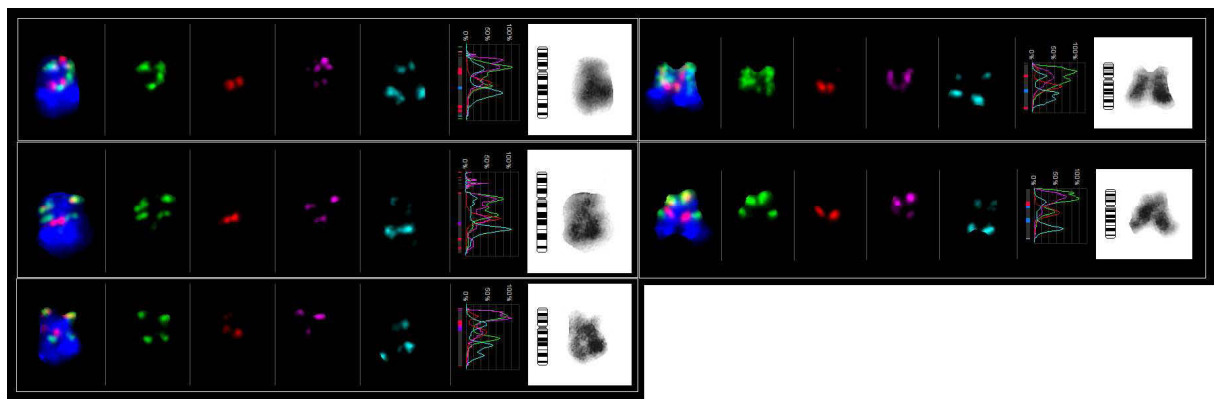
**Tab. 32: Ergebnisse der Hybridisierung im Fall 7.**

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/05	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/05
1	RP11-774P7	8p23	TR	keine Auswertung, da in normalen Zellen kein BAC informativ			8	2
	RP11-594D21	8p23.1	SG				9	1
	RP11-115K10	8p21.2	DEAC				-	-
	RP11-803P16	8q11.21	SO				9	1
	RP11-430H18	8q12.1	SG				10	0
	RP11-96G1	8q21.2	DEAC				8	2
2	RP11-351I21	8p23.1	TR	9	0	0	12	4
	RP11-410N18	8p23.3	SG	6	1	0	12	3
	RP11-122L4	8p11.23	DEAC	0	0	9 (1/1/0)	0	17 (1,5/0)
	RP11-513O17	8q12.1	SO	8	1	0	17	0
	RP11-317J10	8q21.2	SG	8	1	0	16	1
	RP11-668K2	8q24.22	DEAC	8	1	0	15	2

Die Ergebnisse der Hybridisierung der verwendeten Mixe im Fall 8 sind in Tab. 33 zusammengefasst. Die Abb. 23 zeigt die Signale der BACs des Mix 1. Es wurden insgesamt elf BACs hybridisiert, von denen keiner als informativ protokolliert werden konnte. Somit ließ sich in diesem Fall die Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 nicht bestimmen.

**Tab. 33: Ergebnisse der Hybridisierung im Fall 8.**

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/05	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/05
1	RP11-774P7	8p23	TR	10	1	2	8	0
	RP11-594D21	8p23.1	SG	12	1	0	8	0
	RP11-115K10	8p21.2	DEAC	12	0	0	8	0
	RP11-803P16	8q11.21	SO	12	0	1	8	0
	RP11-430H18	8q12.1	SG	12	0	0	8	0
	RP11-96G1	8q21.2	DEAC	11	2	0	8	0
2	RP11-774P7	8p23	TR	12	4	2	4	1
	RP11-90I3	8p22	SG	12	3	3	4	1
	RP11-96G1	8q21.2	Cy5	14	3	1	5	0
	RP11-959D4	8q22.2	DEAC	12	5	1	4	1
	RP11-21H16	8q24.22	SO	15	3	0	4	1



**Abb. 23: Hybridisierungsergebnis des Mix 1 auf die Chromosomen des Falls 8.** Die Signalstärken der BAC-Klone sind zwischen den homologen Chromosomen 8 sowohl in den trisomen Zellen (linke Seite) als auch in den nicht trisomen Zellen (rechte Seite) gleich.

Das gleiche Ergebnis wurde bei der Untersuchung des Materials von Fall 9 beobachtet. Hierbei wurden insgesamt fünf BACs hybridisiert. Keiner der BACs war informativ und zeigte Signalunterschiede (siehe Tab. 34).

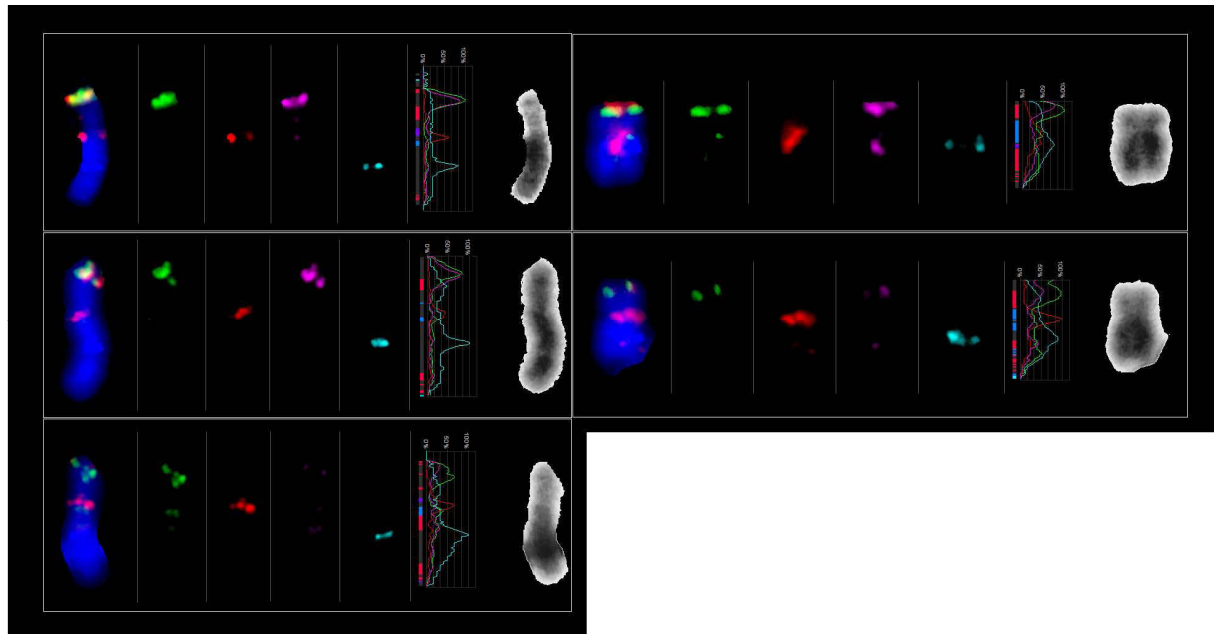
Tab. 34: Ergebnisse der Hybridisierung im Fall 9.

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/05	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/05
1	RP11-774P7	8p23	TR	12	2	0	4	2
	RP11-90I3	8p22	SG	6	3	1	4	1
	RP11-96G1	8q21.2	Cy5	6	3	0	4	0
	RP11-959D4	8q22.2	DEAC	6	0	1	-	-
	RP11-21H16	8q24.22	SO	8	3	0	4	1

Bei Fall 10 wurden drei SONDENSSETS mit insgesamt 17 BACs zusammengestellt. Vier dieser BACs zeigten sich bei der Auswertung als informativ (Vgl. Tab. 35). Diese BACs befinden sich alle in der zytogenetischen Bande 8p23. In Abb. 24 ist das Hybridisierungsergebnis des Mix 1 dargestellt.

Tab. 35: Ergebnisse der Hybridisierung der BACs im Falls 10.

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/05	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/05
1	RP11-774P7	8p23	TR	2	7	2	0	3
	RP11-594D21	8p23.1	SG	2	7	2	0	3
	RP11-115K10	8p21.2	DEAC	-	-	-	-	-
	RP11-803P16	8q11.21	SO	6	2	2	3	0
	RP11-430H18	8q12.1	SG	-	-	-	-	-
	RP11-96G1	8q21.2	DEAC	8	2	1	3	0
2	RP11-351I21	8p23.1	TR	4	12	3	0	3
	RP11-410N18	8p23.3	SG	-	-	-	-	-
	RP11-122L4	8p11.23	DEAC	15	1	4	3	0
	RP11-513O17	8q12.1	SO	13	3	3	3	0
	RP11-317J10	8q21.2	SG	12	4	2	3	0
	RP11-668K2	8q24.22	DEAC	16	4	0	3	0
3	RP11-774P7	8p23	TR	1	13	3	0	4
	RP11-90I3	8p22	SG	13	4	0	4	0
	RP11-96G1	8q21.2	Cy5	13	3	1	4	0
	RP11-959D4	8q22.2	DEAC	12	3	2	4	0
	RP11-21H16	8q24.22	SO	16	1	0	4	0



**Abb. 24: Hybridisierungsergebnis des Mix 1 auf die Suspension des Falls 10.** Die Signalstärken der BAC-Klone RP11-774P7 in TR sowie RP11-594D21 in SG sind zwischen den homologen Chromosomen 8 sowohl in den trisomen Zellen (linke Seite) als auch in den nicht trisomen Zellen (rechte Seite) verschieden.

Die Knochenmarksuspensionen der Fälle 11 und 13 ließen keine Auswertung zu. Hier waren die Menge an Zellsuspension sowie die Anzahl der Metaphasen zu gering.

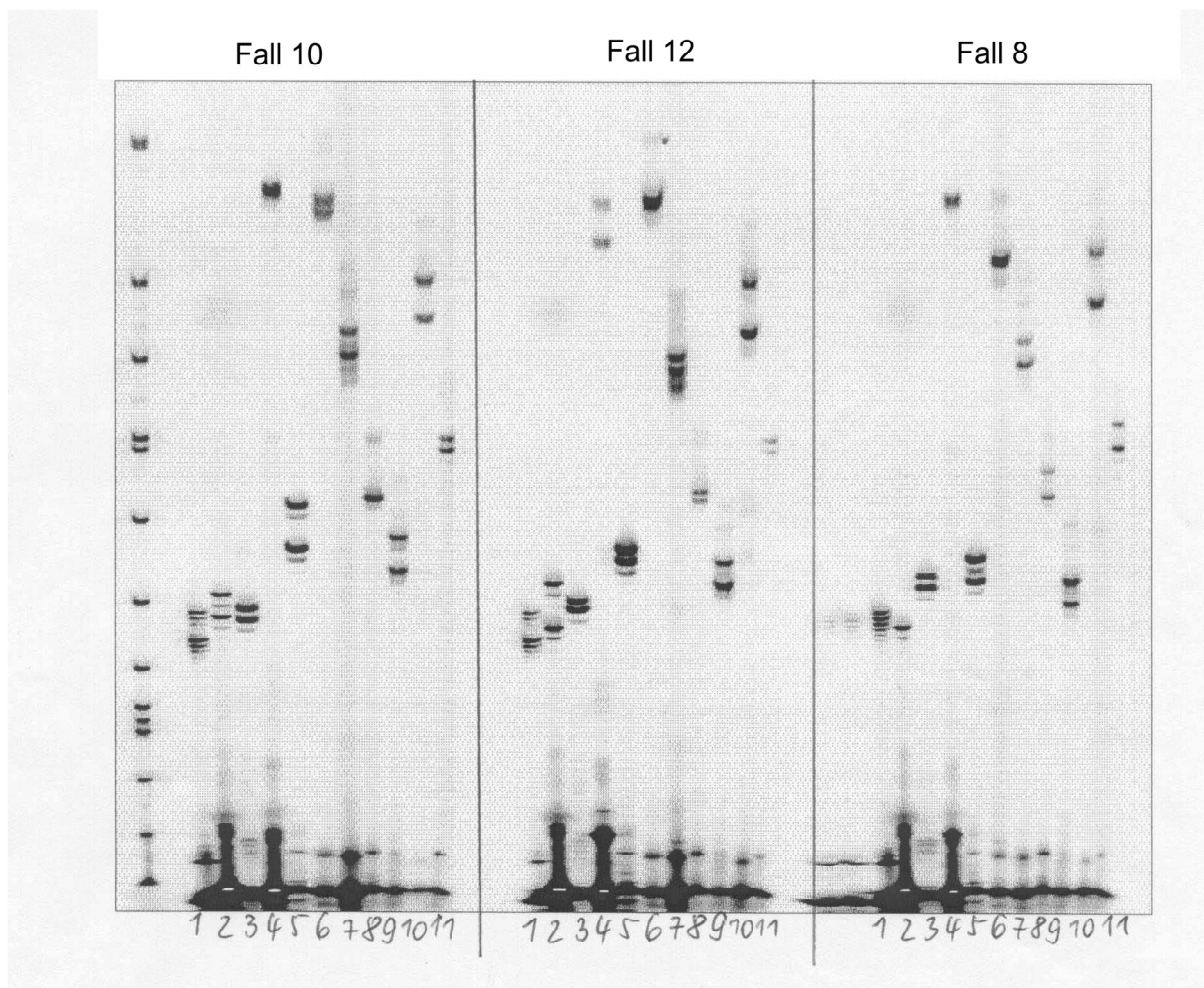
Für Fall 12 wurden zwei Mixe mit insgesamt elf BACs hybridisiert. Die Auswertung zeigte, dass keiner der BACs Signalunterschiede aufwies (siehe Tab. 36). Folglich konnte kein Rückschluss auf die Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 gezogen werden.

**Tab. 36: Ergebnisse der Hybridisierung im Fall 12.**

Mix	BAC	Lage	Markierung	Zellen mit Trisomie 8			Zellen ohne Trisomie 8	
				1/1/1	1,5/1,5/05	1,5/0,5/0,5	1/1	1,5/05
1	RP11-774P7	8p23	TR	5	1	1	4	0
	RP11-594D21	8p23.1	SG	7	0	0	4	0
	RP11-115K10	8p21.2	DEAC	1	1	1	4	0
	RP11-803P16	8q11.21	SO	8	3	0	4	0
	RP11-430H18	8q12.1	SG	-	-	-	-	-
	RP11-96G1	8q21.2	DEAC	11	0	0	4	0
2	RP11-774P7	8p23	TR	18	2	0	4	2
	RP11-90I3	8p22	SG	9	4	4	4	1
	RP11-96G1	8q21.2	Cy5	14	4	3	4	0
	RP11-959D4	8q22.2	DEAC	-	-	-	-	-
	RP11-21H16	8q24.22	SO	12	6	3	4	1

### 3.4.3 Bestimmung der Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 bei AML mit Trisomie 8 mittels Mikrosatellitenanalyse

Die Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 sollte, unabhängig von dem pod-FISH Ergebnis, mit einer weiteren Methode bestimmt werden. Es wurden drei AML-Fälle mit Trisomie 8 ausgewählt (Fall 8, 10, und 12) und ca. 20 Zellkerne pro Fall mit Mikrosezierung gesammelt (siehe 2.4.2). Um eine ausreichende Ausgangskonzentration für die Mikrosatelliten-PCR zu erreichen, wurde die DNA mit einer DOP-PCR amplifiziert (siehe 2.3.2.1). Die Konzentration der DNA wurde anschließend auf 50 ng/µl eingestellt und eine Mikrosatelliten-PCR mit Primern aus verschiedenen Mikrosatellitenregionen im Chromosom 8 durchgeführt (siehe 2.3.2.4). Die verwendeten Primer sind in Tab. 55 im Anhang zusammengefasst. Anschließend wurde die Größe der Fragmente durch Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.3.2.5) (siehe Abb. 25).



**Abb. 25: Gelelektrophorese der Proben nach Mikrosatelliten-PCR.** Pro Fall wurden elf verschiedene Primerpaare verwendet. Der Längenstandard wurde jeweils ganz links aufgetragen.

Im Fall 10 waren für jedes Primerpaar zwei Banden im Gel sichtbar, d.h. es wurden zwei Fragmente unterschiedlicher Größe amplifiziert. Zusätzlich waren die Banden ungefähr gleich stark. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass in diesem Fall keine UPD vorlag. Dies stimmte überein mit den Ergebnissen der pod-FISH Untersuchung. Hier wurden vier informative BACs aus 8p23 nachgewiesen, die Signalunterschiede zwischen den homologen Chromosomen zeigten. Zwei der informativen Primer, D8S1099 und D8S264, sind ebenfalls in 8p23 lokalisiert.

Bei Fall 12 waren das Ergebnis der Gelelektrophorese zwei Banden, die unterschiedlich stark waren. Die Herkunft der schwächeren Bande konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Während der Mikrosezierung wurden 20 Zellkerne gesammelt. Dabei war es nicht möglich, visuell zwischen trisomen und nicht trisomen Zellen zu unterscheiden. Die schwächere Bande könnte also ein Signal der normalen Zellen sein und in den trisomen Zellen läge eine UPD vor. Es wäre aber ebenso möglich, dass keine UPD in diesem Fall vorhanden ist und ein Chromosom verdoppelt vorlag. Dann würden die gleichen Signalkonstellationen im Gel auftreten. Ein Ergebnis konnte mit pod-FISH in diesem Fall nicht erzielt werden. Alle verwendeten BAC-Klone waren nicht informativ.

Bei Fall 8 zeigte die Gelelektrophorese das gleiche Ergebnis wie bei Fall 2. Es waren eine starke und eine schwache Bande sichtbar. Da hier ebenfalls nur 80 % trisome Zellen vorlagen, konnte die Herkunft der schwächeren Bande nicht geklärt werden. Auch das pod-FISH Ergebnis war negativ. Alle elf verwendeten BAC-Klone waren nicht informativ.

Zur Bestimmung der Herkunft der schwachen Bande in Fall 12 und 8, wurde eine Methode gesucht, um gezielt trisome Zellen sammeln zu können. Es wurde die Methode der FISH-Mikrosezierung gewählt (siehe 2.4.3). Die FISH-Mikrosezierung und die anschließende Mikrosatellitenanalyse wurden von Frau Vera Witthuhn durchgeführt. Mit der Methode der FISH-Mikrosezierung war es möglich, die trisomen Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop durch eine vorangegangene FISH mit Zentromerproben für das Chromosom 8 zu identifizieren und mittels Mikrosezierung zu sammeln. Nach der FISH-Mikrosezierung wurden die Zellen einem Proteinverdau unterzogen und über eine DOP-PCR amplifiziert. Anschließend erfolgte eine Mikrosatelliten-PCR und Visualisierung der Fragmente auf dem Gel (siehe Kapitel 2). In der anschließenden Auswertung konnten keine Banden auf dem Gel sichtbar gemacht werden. Daraufhin wurden verschiedene Schritte im Protokoll verändert. Es wurde beispielsweise gleich nach der FISH-Mikrosezierung eine Mikrosatelliten-PCR durchgeführt, ohne den Schritt der DOP-PCR. Die Konzentrationen der verschiedenen PCR-Reagenzien und der DNA-Proben wurden verändert. Ebenso wurde die Zusammensetzung des Sammeltröpfens für die Mikrosezierung variiert. Auch diese Veränderungen führten zu keiner Verbesserung des Ergebnisses. Es waren weiterhin keine Banden auf dem Gel sichtbar.



## 4 Diskussion

Die Diskussion ist in zwei Teile untergegliedert. Im ersten Teil werden die Ergebnisse der molekularzytogenetischen Untersuchungen der AML-Fälle diskutiert. Im zweiten Teil liegt der Fokus auf der neu etablierten Methode des pod-FISH und deren Anwendung bei AML-Fällen.

### 4.1 Molekularzytogenetische Untersuchungen der AML-Fälle

#### 4.1.1 Detektierte Aberrationen mittels einer gesamtgenomischen Untersuchung bei NK-AML

In dieser Arbeit wurden erstmalig AML-Fälle mit zytogenetisch normalem Karyotyp mit den gegenwärtig neuesten molekularzytogenetischen Methoden umfassend analysiert. Hierfür wurde die gesamtgenomische FISH-Methode des mMCB verwendet (Weise *et al.*, 2003) (siehe 1.3.4). Diese Methode stellt eine Weiterentwicklung des MCB dar, das erstmals 1999 von Chudoba *et al.* beschrieben wurde. Es wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie, Jena entwickelt und besteht aus mikrosezierten, regionspezifischen DNA-Banken, die mit verschiedenen Fluorochromen markiert werden und so bei der FISH ein spezifisches Bandenmuster entlang der Chromosomen erzeugen. Mit dem mMCB lassen sich verschiedene Chromosomenaberrationen, wie beispielsweise Translokationen, Deletionen oder Inversionen nachweisen. U.a. wurde das mMCB bereits erfolgreich für die Suche nach kryptischen Aberrationen bei akuten lymphatischen Leukämien angewendet (Karst *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit ausgewählten AML-Fälle mit zytogenetisch unauffälligem Karyotyp wurden mit mMCB auf kryptische Aberrationen untersucht. Es zeigte sich, dass in etwa 40 % der Fälle Auffälligkeiten in der Auswertung auftraten. Bei diesen Auffälligkeiten handelte es sich entweder um Veränderungen in der Bandenabfolge einzelner Chromosomen oder um Deletionen in den Subtelomerbereichen. Diese Auffälligkeiten wurden dann mit weiteren lokusspezifischen FISH-Sonden näher untersucht, konnten aber in nur zwei Fällen bestätigt werden. In den verbleibenden Fällen wurden die Aberrationen mit lokusspezifischen Einzelsonden nicht nachgewiesen.

Bei dem ersten der beiden Fälle (Fall 5) wurden in elf Metaphasen eine Deletion im terminalen Ende des kurzen Arms von Chromosom 5 und in vier Metaphasen eine Deletion im terminalen Ende des langen Arms von Chromosom 5 nachgewiesen. Die Größe der Deletionen ließ sich auf Grund der Hybridisierung eines BACs auf minimal 100 kb eingrenzen. Um die deletierte Region nach möglichen Tumorsuppressor- bzw. Protoonkogenen zu analysieren, wurde eine Datenbankanalyse durchgeführt. Die deletierte Region in 5p ist laut Datenbank genarm. In einem Bereich von 1000 kb distal und proximal der deletierten BAC-Sequenz sind gegenwärtig nur vier Gene bekannt. Drei dieser Gene gehören zur Familie der Iroquois-Gene, die für Transkriptionsfaktoren codieren, die wahrscheinlich in die Embryonalentwicklung involviert sind. Zu dieser Familie gehören insgesamt sechs Gene, die in zwei Genclustern in 5p13.3 sowie 16q12.2 angeordnet sind (Wu *et al.*, 2006). Das vierte

Gen im möglichen Bereich der deletierten Region ist *CEI* (*Coordinated Expression to IRXA2*), das einen offenen Leserahmen für ein unbekanntes Protein darstellt. Es liegt in der Nähe von *IRX2*, einem Gen der Iroquois-Familie. Beide teilen sich höchstwahrscheinlich einen bidirektionalen Promotor (Takai und Jones, 2004). *CEI* ist spezifisch für höhere Primaten, da es nur beim Menschen und Schimpansen gefunden wurde. Sowohl die Gene der Iroquois-Familie als auch das Gen *CEI* sind gegenwärtig in keinem Zusammenhang mit Tumoren bzw. Tumorentstehung publiziert. Die Untersuchungen in diesem AML-Fall zeigten ebenfalls eine klonale Deletion im terminalen Ende des langen Arms von Chromosom 5. Der deletierte BAC befindet sich in einem Abstand zum Telomer 5p von 180.512-180.626 kb. Diese Region ist genreicher als die deletierte Region in 5p. Es sind gegenwärtig sieben Gene aus vier verschiedenen Genfamilien bekannt. Drei Gene (*TRIM7*, *TRIM41* und *TRIM52*) gehören zur Familie der „*tripartite motif*“, deren Genprodukte in verschiedene Zellprozesse wie z.B. Zellproliferation, Differenzierung, Entwicklung, Onkogenese und Apoptose involviert sind (Nisole *et al.*, 2005). So wurde beispielsweise *TRIM19* bereits bei Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie (AML-M3) als Fusionspartner einer Translokation beschrieben (de The *et al.*, 1991; Kakizuka *et al.*, 1991; Goddard *et al.*, 1991). Tyybäkinoja *et al.* publizierten 2007 eine Studie, in der sie Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie mit array-CGH (siehe 1.3.5) auf kryptische Veränderungen untersuchten. Sie fanden in 50 % der Patienten eine deletierte Region in 13q14.3, in der sich ebenfalls ein Gen der „*tripartite motif*“ Familie, *TRIM13*, befand. Weitere Gene in der deletierten Region in 5q sind *SNORD95* und *SNORD96A*, die für kleine Nukleolus-spezifische RNAs (small nuclear RNA, snoRNA) codieren. Diese steuern im Nukleolus die positions-spezifische Basenmodifikation bei rRNAs (Smith und Steitz 1997; Filipowicz, 2000). Es ist bekannt, dass diese Gene entweder als verstreute Einzelkopien oder als große Cluster, wie z.B. in 15q, vorliegen (Strachan und Read, 2005). Die Gene in 15q sind väterlich geprägt und könnten eine Rolle beim Prader-Willi-Syndrom spielen (Gallagher *et al.*, 2002). Die hier deletierten Gene *SNORD95* und *SNORD96A* wurden hinsichtlich ihrer Prägung noch nicht näher untersucht, so dass die elterliche Prägung möglicherweise auch hier eine Rolle spielen könnte. Weiterhin befinden sich in der deletierten Region noch zwei Gene, *OR2V2* und *GNB2L1*. Ersteres gehört zur Genfamilie der olfaktorischen Rezeptoren, die mit mehr als 900 bekannten Genen auf allen menschlichen Chromosomen zu finden sind und noch nicht im Zusammenhang mit Leukämien beschrieben wurden. Das zweite deletierte Gen, *GNB2L1*, codiert für ein G-Protein (Guanosintriphosphat-bindendes Protein), das als Rezeptor für die aktivierte Proteinkinase C dient und somit eine zentrale Rolle bei der zellulären Signaltransduktion spielt. Auch dieses Gen ist in keiner Publikation mit Tumorentstehung in Zusammenhang gebracht worden. In einem Abstand von ca. 10000 kb zur deletierten Region befindet sich das Gen *NPM1*. Dieses Gen wurde bereits als Fusionspartner in Translokationen bei Leukämien (z.B. AML) und Lymphomen nachgewiesen (z.B. Yoneda-Kato *et al.*, 1996; Falini *et al.*, 2002). Weiterhin wurden in 60 % der NK-AML Fälle Mutationen in *NPM1* nachgewiesen, die somit zu den häufigsten genetischen Veränderungen bei NK-AML zählen (Falini *et al.*, 2005). Eine nähere Eingrenzung der Bruchpunkte der Deletion in 5p und 5q war im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen.

Die detektierten Deletionen in den Subtelomerbereichen des Chromosoms 5 sind für den AML-Subtyp M6 zytogenetisch nicht typisch. Es ist bekannt, dass bei AML in etwa 10-25 % aller Fälle interstitielle Deletionen in 5q auftreten (Pedersen und Jensen, 1991). Jedoch sind die Bruchpunkte dieser Deletionen hauptsächlich in 5q12-q14 bzw. 5q31-33 zu finden und nicht wie hier in diesem Fall in 5q35 (Atlas der Genetik und Zytogenetik in Onkologie und Hämatologie, <http://atlasgeneticsoncology.org//index.html>, Stand April 2008).

Die Untersuchungen an Fall 9 mit mMCB gefolgt von lokusspezifischen DNA-Sonden konnten eine Deletion im Subtelomerbereich von 2q detektieren (2q37.3). Als lokusspezifische DNA-Sonde wurde die TelVysion von dem Unternehmen Abbott verwendet, deren Lokalisation von Abbott mit einem Abstand von ca. 100-300 kb vom Telomer 2q angegeben ist (Macina *et al.*, 1994). In diesem 200 kb großen Bereich sind laut Datenbank nur zwei Gene bekannt, eins davon ein hypothetisches Gen. Das andere Gen, *FLJ41327*, wurde hinsichtlich seiner Funktion noch nicht erforscht. In einem Bereich von 1000 kb proximal der deletierten Region sind mehrere bekannte Gene. Eins davon wurde bereits im Zusammenhang mit Tumoren publiziert. Das Gen *SEPT2* wurde als Translokationspartner mit dem *MLL* Gen im Chromosom 11 bei AML identifiziert (Cerveira *et al.*, 2006). Hier konnte es im Subtyp M2 sowie M4 beschrieben werden. Distal der deletierten Region sind keine weiteren Gene, denn es schließt sich der Telomerbereich an. Eine weitere Eingrenzung der Deletion war im Rahmen der Arbeit nicht vorgesehen. Bekannt ist, dass eine AML-M0 nicht mit einer Deletion im Subtelomerbereich von 2q assoziiert ist. Häufige Chromosomenaberrationen bei AML-M0 sind beispielsweise komplexe Karyotypveränderungen oder ein Zugewinn von Chromosom 8 (Klaus *et al.*, 2004). Normale Karyotypen werden bei ca. 25 % der Fälle diagnostiziert (Atlas der Genetik und Zytogenetik in Onkologie und Hämatologie).

In zwei weiteren NK-AML Fällen wurde bei der Auswertung mit mMCB eine zusätzliche dunkle Bande in 14pter detektiert, die sich mit keiner weiteren lokusspezifischen DNA-Sonde anfärben ließ. Da diese Veränderung in 100 % der Zellen nachgewiesen wurde, ist nicht von einer leukämieassoziierten Aberration sondern von einem konstitutionellen Polymorphismus auszugehen.

#### 4.1.2 Trisomie 8 AML-Fälle

Weiterhin wurden in dieser Arbeit erstmalig sechs AML-Fälle mit Trisomie 8 als alleinige Chromosomenaberration mit mMCB untersucht. Die Trisomie 8 tritt häufig als sekundäre Aberration bei AML auf. Die Untersuchung mit mMCB hatte zum Ziel eine Identifizierung leukämischer Marker, die möglicherweise eine primäre genetische Veränderung darstellen. Zur Detektion dieser leukämischen Marker wurden sowohl die trisomen als auch die nicht trisomen Metaphasen vergleichend analysiert. Die Auswertung zeigte keine Auffälligkeiten in den Fluoreszenzsignalen der Chromosomen, der Karyotyp blieb außer dem bereits bekannten Zugewinn des Chromosoms 8 zytogenetisch unauffällig. Gegenwärtig gibt es nur wenige Studien, die AML-Fälle mit Trisomie 8 als alleinige Aberration mit FISH untersucht haben. Heller *et al.* publizierten 2003 eine Studie, in der acht AML- und MDS-Fälle mit Trisomie 8 mit MCB für Chromosom 8 untersucht wurden. In keinem der

Chromosomen 8 konnten Veränderungen beschrieben werden. Weiterhin untersuchten Paulsson *et al.* (2003) 13 AML- und MDS-Fälle mit Trisomie 8 als alleiniger Aberration mit M-FISH sowie lokusspezifischen FISH-Sonden der Subtelomere 8p und 8q als auch der leukämieassoziierten Gene *FGFR1*, *MOZ*, *ETO* und *MYC*. In dieser Studie wurden ebenfalls keine Veränderungen in den Chromosomen 8 entdeckt.

#### 4.1.3 Anwendung mMCB bei AML-Fällen

Dies ist die erste Arbeit, in deren Rahmen eine gesamtgenomische Untersuchung von NK-AML Fällen sowie AML-Fällen mit Trisomie 8 als alleinige Aberration mit Hilfe der gegenwärtig neuesten molekularzytogenetischen Methode, des mMCB, erfolgte. Die Methode des mMCB führte wie oben ausgeführt zum Nachweis kryptischer Aberrationen bei 2 von 31 NK-AML Fällen. Die Methode des mMCB zur Identifizierung kryptischer Aberrationen bei Tumorfällen wurde bereits im Vorfeld der Arbeit eingeführt (Weise *et al.*, 2003). So wurde das mMCB beispielweise auf Knochenmarksuspensionen zweier Fälle mit MDS angewendet und führte in einem der beiden Fälle zum Nachweis einer klonalen, kryptischen Deletion in 9q33, die zytogenetisch nicht sichtbar war. Weiterhin konnten diese Veränderungen in zwei Tumorzelllinien mit komplexen Karyotypveränderungen mit mMCB nachgewiesen und die Bruchpunkte auf FISH-Ebene exakt charakterisiert werden. Ferner eignet sich das mMCB für die Anwendung auf Zellgemischen, wie z.B. bei AML-Fällen, in denen ein Gemisch aus gesunden und leukämischen Zellen vorhanden ist, da der Nachweis von Aberrationen, die nur in einer geringen Anzahl der Metaphasen sichtbar sind, hier möglich ist. Auch konnte diese FISH-Methode bereits erfolgreich für die Identifizierung kryptischer Aberrationen bei ALL eingesetzt werden (Karst *et al.*, 2006).

AML-Fälle mit normalem Karyotyp stellen klinisch und genetisch eine heterogene Gruppe dar (Estey und Döhner, 2006). Auf Grund des normalen Karyotyps können sie zytogenetisch nicht einer bestimmten prognostischen Gruppe zugeordnet werden (Mrózek *et al.*, 1997). Es gibt mehrere Studien, bei denen FISH-Untersuchungen zur Identifizierung kryptischer Aberrationen bei NK-AML Fällen durchgeführt wurden (Zhang *et al.*, 2000; Mohr *et al.*, 2000; Cuneo *et al.*, 2002; Fröhling *et al.*, 2002; Fröhling *et al.*, 2005). Die aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangenen Ergebnisse ähneln den bereits publizierten Studien. Mit der FISH-Methode des mMCB konnten nur in 6 % der NK-AML Fälle Aberrationen detektiert werden. Das mMCB bietet den Vorteil, dass in nur einer Hybridisierung alle MCB-spezifischen Bänderungen der Chromosomen realisiert werden können. So ist es möglich, zytogenetisch nicht sichtbare Veränderungen wie z.B. kryptische Veränderungen oder Veränderungen, die eine zytogenetische Bande betreffen (z.B. Inversionen oder Translokationen), zu detektieren. Des Weiteren hat das mMCB gegenüber anderen gesamtgenomischen FISH-Methoden wie M-FISH oder SKY den Vorzug, dass auch intrachromosomale Veränderungen wie z.B. Inversionen beschrieben werden können. Bei der Untersuchung der Subtelomere stößt die Methode allerdings an ihre Grenzen, denn die Signale werden zu den Telomeren hin schwächer, so dass oftmals eine exakte Aussage über Veränderungen in diesen Bereichen nicht möglich ist. In diesem Fall

müssen in einem weiteren Schritt lokusspezifische Sonden eingesetzt werden (siehe 4.1.4). Weiterhin gibt es Schwierigkeiten bei der Auswertung kleinerer Chromosomen (Chromosomen 19-22). Diese sind bei Knochenmarksuspensionen sehr kurz und färben sich teilweise mit den DNA-Sonden des mMCB nur ungenügend an. Folglich ist es schwierig, die einzelnen Banden zu erkennen und in ihrer Größe bzw. Reihenfolge auf dem Chromosom zu bewerten. Deswegen eignet sich das mMCB nur eingeschränkt für die Detektion kryptischer Aberrationen in diesen Chromosomen. Hierzu sollten ebenfalls chromosomenspezifische Sonden, wie z.B. Einzel-MCBs angewendet werden. Mit mMCB lassen sich ebenfalls nur schwierig kryptische Veränderungen im Y-Chromosom erkennen, da ein Referenzchromosom zum Vergleich der Größe und Lage der einzelnen Banden fehlt. Ebenfalls besteht ein Nachteil der Methode im Nachweis von balancierten Translokationen oder kryptischen Inversionen. Betreffen die Translokationen Bereiche, die mit gleichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, dann sind diese in der Auswertung nicht sichtbar. Ebenso können kryptische Inversionen, die innerhalb einer DNA-Sonde auftreten, nicht nachgewiesen werden. Schließlich ist ein limitierender Faktor bei der mMCB Auswertung in der Anzahl der Metaphasen zu sehen. Um eine Aussage über mögliche Aberrationen treffen zu können, müssen pro Fall mindestens 15 Metaphasen analysiert werden. Bei der Analyse der AML-Fälle mit Trisomie 8 wird eine noch höhere Anzahl an Metaphasen benötigt, da sowohl die trisomen als auch die nicht trisomen Zellen untersucht werden. Oftmals enthalten Knochenmarksuspensionen wenige proliferierende Zellen, so dass die Anzahl an Metaphasen für eine Auswertung zu gering ist. Ferner kann nicht jede Metaphase ausgewertet werden, denn die Chromosomen sollten sich in den Metaphasen möglichst nicht überlagern und die Hybridisierungsqualität muss gut bis sehr gut sein, damit die Färbungen der einzelnen DNA-Sonden sicher zu erkennen ist.

Des Weiteren existieren Studien von NK-AML Fällen und deren Untersuchungen mit CGH (siehe 1.3.5). Dalley und Mitarbeiter (2002) wendeten die Methoden der CGH sowie die des M-FISH an, um NK-AML Fälle zu analysieren. In diesen Fällen wurden weder mit CGH noch mit M-FISH Aberrationen entdeckt. Ebenso wurde 2004 von Casas *et al.* eine Studie publiziert, in der 45 NK-AML Fälle mit CGH untersucht wurden. In keinem der Fälle konnten kryptische Aberrationen detektiert werden. Auch diese Ergebnisse gleichen den Ergebnissen der mMCB Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit. Weiterhin wurden im Vorfeld dieser Arbeit 17 der NK-AML Fälle bereits mit CGH untersucht (siehe 3.1.1). In keinem der Fälle konnten Aberrationen mit CGH beschrieben werden. Allerdings bietet das mMCB gegenüber der CGH die Vorteile, dass balancierte Veränderungen sichtbar werden könnten und dass mit mMCB Einzelzellen anstelle von Zellgemischen untersucht werden können.

Die oben beschriebenen molekularzytogenetischen Methoden haben teilweise ihre Grenzen in der gesamtgenomischen Abdeckung (wie beispielsweise bei lokusspezifischen FISH-Sonden) oder in der Auflösung. Eine verbesserte Auflösung bietet der Einsatz molekulargenetischer Methoden, wie beispielsweise verschiedener PCR-Methoden, Genexpressionsanalysen oder direkter Sequenzierung, die zur Identifizierung genetischer Veränderungen bei NK-AML führen. Dazu zählen interne Tandemduplikationen des *FLT3* Gens (13q12.2), die erstmals 1996 von Nakao *et al.* im Zusammenhang mit AML aufgeführt wurden. Weiterhin sind Mutationen im *NPM1*

Gen (5q35) die häufigsten Genmutationen bei NK-AML (z.B. Falini *et al.*, 2005; Schnittger *et al.*, 2005; Boissel *et al.*, 2005). Sie treten in ca. 46-62 % der untersuchten NK-AML Fälle auf. Ferner wurden z.B. Veränderungen im *MLL* Gen (11q23) (Caligiuri *et al.*, 1994; Schichman *et al.*, 1994) sowie Überexpression des *BAALC* Gens (8q22.3) (Baldus *et al.*, 2003, 2006) beschrieben. Die Grenze der gesamtgenomischen Abdeckung mit einer hohen Auflösung wurde mit der Entwicklung der array-CGH überwunden (siehe 1.2.5). Tyybäkinoja *et al.* publizierten 2007 eine Studie, in der 26 NK-AML Fälle mit array-CGH auf kryptische Aberrationen untersucht wurden. In 15 % der Fälle wurden Veränderungen, die eine Größe von 0,4-4,1 Mb trugen, nachgewiesen. Im Vergleich zum mMCB ist es mit array-CGH nicht möglich, balancierte Translokationen oder Inversionen zu detektieren. Dies ist mit mMCB erreichbar, wenn diese Veränderungen nicht unterhalb des Auflösungsvermögens liegen und in Bereichen auftreten, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Weiterhin ist es mit array-CGH nur schwer möglich, Veränderungen, die nur in einer geringen Anzahl der Zellen auftreten, zu detektieren. Dies ist in der Regel bei Tumoren der Fall, da häufig im Knochenmark oder Blut ein Zellgemisch vorliegt, das neben Tumorzellen auch gesunde Zellen enthält. Hier bietet das mMCB gegenüber der CGH den Vorteil, dass die Analysen auf Einzelniveau erfolgen können. Der Nachteil ist, dass nur die proliferierenden Zellen, also die Metaphasen ausgewertet werden können. Aberrationen, die in den nicht proliferierenden Zellen vorliegen, bleiben unerkannt.

#### 4.1.4 Detektierte Aberrationen der Subtelomerbereiche bei NK-AML

Die vorangegangenen Untersuchungen mit mMCB haben gezeigt, dass mit Hilfe dieser Methode vor allem Aberrationen in den Subtelomerbereichen sichtbar gemacht werden können. Da jedoch die Signalstärken der DNA-Sonden zu den Telomeren hin schwächer werden, ist eine eindeutige Aussage über Aberrationen in diesen Bereichen oftmals nicht möglich. Deswegen wurden in weiteren Untersuchungen die Subtelomerbereiche der Chromosomen 5, 9, 11, 12 und 13 genauer untersucht, da diese Chromosomen bei Leukämien am häufigsten in Aberrationen involviert sind (Atlas der Genetik und Zytogenetik in Onkologie und Hämatologie). Dazu wurden lokusspezifische DNA-Sonden (BACs) verwendet und die Untersuchungen sowohl in den sich teilenden Zellen der Kultur (Metaphasen) als auch in den sich nicht teilenden Zellen der Kultur (Interphasekerne) durchgeführt. Die Ergebnisse der Auswertungen nach FISH zeigten, dass in 14 von 22 untersuchten Fällen Veränderungen in Form von Deletionen oder Duplikationen beschrieben werden konnten.

In drei Fällen konnte eine Deletion in 5q35.3 nachgewiesen werden. Bei dieser Deletion in 5q35.3 ist die gleiche Region, wie bereits in 4.1.1 beschrieben, betroffen. Bei allen drei Fällen handelte es sich um Material von Patienten, die männlich, zwischen 43 und 65 Jahre alt waren und bei denen verschiedene FAB-Klassifikationen diagnostiziert wurden (1x AML-M1, 1x AML-M2, 1x AML aus MDS). Der vierte Patient mit dieser Deletion (aus 4.1.1) war ebenfalls männlich, 62 Jahre alt und hatte eine AML-M6. Anhand der verschiedenen Subklassen, in denen die

kryptische Deletion beschrieben wurde, zeigt sich, dass diese nicht mit einer bestimmten Subklasse assoziiert werden kann.

Weiterhin wurde in ebenfalls drei der Fälle (2x AML-M2, 1x AML-M5) eine Deletion in 9p24.3 nachgewiesen. Auf Grund der für die Hybridisierung verwendeten BACs, lässt sich die Größe der Deletion auf mindestens 277 kb eingrenzen. Laut Datenbankanalysen sind in diesem Bereich gegenwärtig drei Gene bekannt. Zwei dieser Gene (*CWBD1* und *C9orf66*) haben bislang noch nicht erforschte Genprodukte. Das dritte Gen, *DOCK8*, gehört mit ca. 180 kb zu den größeren Genen im menschlichen Genom und codiert für ein Protein, das eine Rolle sowohl in der Zytokinese als auch in der Organisation von filamentösem Aktin inne hat (Griggs *et al.*, 2008). Die Deletion dieses Gens wurde beispielsweise bereits in Lungenkrebs (Takahashi *et al.*, 2006) und Fällen mit mentaler Retardierung (Griggs *et al.*, 2008) beschrieben. Da diese Deletion größer sein könnte als der Bereich den die BACs eingrenzen, wurde in der Datenbank 1000 kb distal und proximal der deletierten Region nach Genen gesucht. In unmittelbarer Nähe distal befindet sich das *FOXD4* Gen, Mitglied einer großen Genfamilie, die für Transkriptionsfaktoren codieren und evolutionär stark konserviert sind (Pierrou *et al.*, 1994; Larsson *et al.*, 1995, Myatt und Lam, 2007). Viele Gene aus dieser Familie spielen eine Schlüsselrolle in der Embryogenese (Kaufmann *et al.*, 1996). Weiterhin ist bekannt, dass die FOX-Proteine Expressionen anderer Gene meist durch die Verstärkung von Kofaktoren aktivieren oder auch unterdrücken können (Myatt und Lam, 2007). Ebenso wurde ihnen in Mausmodellen eine Rolle bei der Tumorentstehung nachgewiesen. Eine Deregulierung der Proteine führt zur Tumorbildung und Fortschreiten der Krebsbildung (Myatt und Lam, 2007). Da sie eine Rolle sowohl als Tumorsuppressor als auch als Onkogene spielen, kommt ihnen eine große Bedeutung als molekulare Ziele in der Krebstherapie zu. Proximal der deletierten Region liegen drei weitere Gene *DMRT1*, *DMRT2* und *DMRT3*, die zu einer Genfamilie gehören und die ebenfalls wie die FOX Gene für Transkriptionsfaktoren codieren, die evolutionär stark konserviert sind (Hong *et al.*, 2007). Sie spielen eine Rolle bei der Entwicklung der Geschlechtsorgane. So wurde beispielsweise beim Mensch eine Deletion des *DMRT1* Gens bei Patienten mit Fehlbildungen der männlichen Geschlechtsorgane nachgewiesen (Ottolenghi und McElreavey, 2000). Eine Rolle in anderen Bereichen, wie z.B. in der Tumorentstehung, konnte noch nicht beschrieben werden. Das vierte, proximal der deletierten Region gelegene Gen heißt *ANKRD*, dessen Genprodukt hinsichtlich seiner Funktion noch nicht näher erforscht wurde. Bezüglich der FAB-Klassifikation wurde bei 2 der 3 Patienten mit Deletion in 9p, die beide zum Zeitpunkt der Erstdiagnose auch ein hohes Alter hatten (71 bzw. 74 Jahre), eine AML-M2 diagnostiziert. Der dritte Patient war bei der Erstdiagnose 48 Jahre alt und hatte eine AML-M5b. Somit ist es wie bei der Deletion in 5p auch hier nicht möglich, eine Verbindung zwischen Aberration und FAB-Klassifikation herzustellen.

Veränderungen im Chromosom 11 konnten in 4 der 14 Fälle nachgewiesen werden, davon wurde bei zwei Patienten eine Deletion im Subtelomerbereich 11p identifiziert (1x AML-M2, 1x AML aus MDS). Die Größe der Deletion beträgt mindestens 274 kb, bestimmt durch die verwendeten BACs aus diesem Bereich. Laut Datenbankanalysen ist diese Region sehr genreich, es sind mehr als zehn Gene bekannt. Jedoch wurden bisher bei keinem dieser Gene Veränderungen bei

Tumorpationen gefunden. Auch die angrenzenden Regionen sind sehr reich. Distal in einem Bereich von 600 kb bis zum Telomer 11p sind gegenwärtig 25 Gene bekannt. Eines dieser Gene wurde bereits als ein tumorrelevantes Gen publiziert. So gehört *HRAS* zur Familie der *RAS* Gene, die als Protoonkogene an einer Vielzahl von Tumoren beteiligt sind (Barbacid, 1987; Bos *et al.*, 1989). Proximal befinden sich in einer Region von ca. 1000 kb mehr als 14 Gene, bei denen gegenwärtig keine Verbindung zu Tumoren nachgewiesen ist. Der kurze Arm vom Chromosom 11, besonders der Bereich in 11p15, ist bei Leukämien häufig in Translokationen oder Inversionen involviert. Jedoch befindet sich der Bruchpunkt in 11p15 fast immer im *NUP98* Gen, das bei ca. 3700 kb (Abstand zum Telomer 11p) lokalisiert ist. Die in dieser Arbeit detektierten Deletionen in 11p15 liegen bei ca. 600-900 kb. Auf Grund fehlender BACs aus den angrenzenden Regionen konnte nicht untersucht werden, ob das *NUP98* Gen ebenfalls deletiert vorliegt. Jedoch konnten van Zutven *et al.* 2006 zeigen, dass Deletionen in diesem Gen bei NK-AML nicht oder nur sehr selten auftreten. Hierfür wurden Patienten mit AML sowie zytogenetisch normalem Karyotyp auf Deletionen oder Translokationen, in die *NUP98* involviert ist, untersucht. In keinem der AML-Fälle konnte eine Veränderung in dem Gen nachgewiesen werden, was impliziert, dass diese Veränderungen bei NK-AML sehr selten vorkommen und auch nicht auf Grund schlechter Morphologie der Chromosomen bzw. zu kleinen veränderten Bereichen (*NUP98* ist am Telomer von 11p lokalisiert) zytogenetisch nicht sichtbar sind.

Neben der Deletion in 11p konnten bei zwei weiteren Fällen eine Deletion bzw. eine Duplikation des Subtelomerbereichs in 11q25 beschrieben werden (1x AML-M4, 1x aus MDS). Die Größe der Deletion beträgt mindestens 450 kb, da die vier für die Hybridisierung verwendeten BACs alle deletiert waren. Die Duplikation lässt sich auf ihre Größe nicht exakt eingrenzen. Für die Auswertung im Interphasekern wurden zur Verbesserung der Signalstärke alle BACs in einer Farbe markiert. Dadurch konnte nicht unterschieden werden, wie viele der BACs dupliziert vorlagen. Auf Grund der zytogenetischen Nähe der BACs ist von einer Duplikation der kompletten Sequenz, welche die BACs eingrenzen, auszugehen. Die deletierte bzw. duplizierte Region ist genarm, denn gegenwärtig sind nur drei hypothetische Gene bekannt, deren Funktionen noch nicht erforscht wurden. Der sich distal an die Region anschließende Bereich enthält in einem Abstand bis 1000 kb keine Gene. Der sich proximal anschließende Bereich ist dagegen reich, denn hier sind gegenwärtig zehn Gene bekannt, deren Produkte unterschiedlichste Zellfunktionen ausüben, aber noch nicht mit Veränderungen in Tumoren beschrieben wurden.

In fünf der untersuchten NK-AML Fälle wurde eine Aberration im Subtelomerbereich von Chromosom 12 gefunden. In vier dieser Fälle konnte eine Deletion nachgewiesen werden, die mindestens 509 kb groß ist und sechs bekannte Gene enthält. Eines dieser Gene, *JARID1A*, wurde bereits im Zusammenhang mit AML beschrieben (van Zutven *et al.*, 2006). Es konnte als Fusionspartner von *NUP98* (11p15) identifiziert werden. Distal sind keine weiteren Gene bekannt, da sich der Telomerbereich anschließt. Proximal in einem Bereich von 1000 kb liegen mehrere Gene, von denen aber laut Datenbank nur eins, das *ELKS* Gen, bereits mit Krebs in Verbindung gebracht wurde. Es wurde als Translokationspartner beim Schilddrüsenkarzinom beschrieben (Nakata *et al.*, 1999). Aberrationen in 12p sind



bei AML in Form von Translokationen, in die verschiedene Chromosomen involviert sein können, publiziert. Hier ist das betroffene Gen in 12p13 *ETV6*. Dieses Gen liegt in einem Abstand von 11816 kb zum Telomer 12p. Es ist auszuschließen, dass dieses Gen ebenfalls in den aberranten Fällen der vorliegenden Arbeit deletiert ist, da die Größe der Deletion mit mMCB nachweisbar wäre. So untersuchten beispielsweise Klaus *et al.* 2004 NK-AML Fälle der FAB-Klassifikationen M0, M1 und M2 mit FISH-Proben für leukämierrelevante Gene. Sie konnten in 3 % der Fälle kryptische Aberrationen nachweisen, die zytogenetisch nicht sichtbar waren. Die in dieser Publikation beschriebene Aberration im *ETV6* Gen in 12p13, das entweder deletiert oder transloziert vorlag, trat in ca. 5 % aller AML-Fälle auf. Weiterhin konnten Tyybäkinen *et al.* (2007) bei 2 von 26 analysierten NK-AML Fällen einen Verlust an DNA im Bereich des *ETV6* Gens beschreiben.

Im Subtelomerbereich von Chromosom 13 konnte in drei Fällen eine Deletion beschrieben werden (1x AML-M4, 1x AML-M5b, 1x AML-M6). Die mindestens 300 kb große, deletierte Region enthält vier bekannte Gene. Einem dieser vier Gene, *RASA3*, wird eine Bedeutung bei der Tumorentstehung zugeschrieben. Das Produkt von *RASA3* ist ein GTPase aktivierendes Protein, das die GTPase Aktivität von RAS p21 stimuliert (Bottomley *et al.*, 1998). Es agiert als Suppressor der RAS-Funktion und kontrolliert so Zellproliferation und -differenzierung. Wie bereits erwähnt, üben die *RAS* Gene eine Funktion als Protoonkogene aus und sind deswegen an einer Vielzahl von Tumoren beteiligt (Barbacid, 1987; Bos *et al.*, 1989). Proximal der deletierten Region in 13q34 sind in einem Bereich von 1000 kb mehr als 20 Gene beschrieben, die gegenwärtig in keinen Zusammenhang mit Tumoren gebracht werden können. Distal sind keine Gene vorhanden, da sich der Telomerbereich anschließt. Weiterhin wurde die deletierte Region in 13q34 noch nicht im Zusammenhang mit einer Krebsart beschrieben.

#### 4.1.5 Untersuchungen der Subtelomerbereiche bei AML-Fällen mit Trisomie 8

Die AML-Fälle mit Trisomie 8, die mit mMCB Analysen keine Auffälligkeiten zeigten, wurden ebenfalls mit Subtelomerproben der Chromosomen 9, 11 und 12 nach kryptischen Aberrationen untersucht. In zwei Fällen war die Anzahl der Metaphasen für eine statistische Auswertung zu gering, die anderen vier Fälle zeigten keine Aberrationen in den Subtelomerbereichen. Es existiert lediglich eine Studie von Brown und Mitarbeitern, in der ebenfalls mit FISH-Sonden aus den Subtelomerbereichen aller Chromosomen ein AML-Fall mit Trisomie 8 untersucht wurde und keine Aberrationen nachweisbar waren (Brown *et al.*, 2001).

#### 4.1.6 Bedeutung detektierter Aberrationen in den Subtelomerbereichen

Die chromosomalen Subtelomerregionen zeichnen sich durch einen hohen G-C Gehalt, eine hohe Dichte an CpG-Inseln sowie durch eine Vielzahl an Genen aus und sind transkriptionell aktiv (Saccone *et al.*, 1992; Craig und Bickmore, 1994). Kryptische Veränderungen, wie beispielsweise Deletionen oder Translokationen in den Subtelomerbereichen sind zytogenetisch schwierig zu erkennen, da diese Bereiche bei fast allen Chromosomen als G-negative Banden vorliegen, welche

zytogenetisch einer hellen Bande entsprechen. Es gibt nur einige wenige Publikationen, in denen Aberrationen in den Subtelomerbereichen der Chromosomen bei hämatologischen Erkrankungen beschrieben wurden (z.B. Jaju *et al.*, 1999; Tosi *et al.*, 2000; Martinez-Ramirez *et al.*, 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe lokusspezifischer Subtelomerproben der Chromosomen 5, 9, 11, 12 und 13 22 NK-AML Fälle untersucht. Dabei wurde erstmalig sowohl in den Metaphasen als auch in den Interphasen nach Aberrationen gesucht. Dies ermöglichte einen Vergleich der proliferierenden mit den nicht proliferierenden Zellen. Es konnten in ca. 60 % der Fälle Deletionen oder Duplikationen in diesen Bereichen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Aberrationen in den proliferierenden oder den nicht proliferierenden Zellen und den jeweiligen Aberrationen bestand. Ebenso wurden in den Fällen unterschiedliche Anzahlen von Klonen beschrieben, die zwischen eins und drei Klonen variierten. Eine Publikation, die ebenfalls die Subtelomerregionen von NK-AML Fällen mit lokusspezifischen FISH-Sonden beschreibt, wurde 2002 von Brown *et al.* veröffentlicht. In dieser Arbeit wurde ein M-Tel Mix verwendet, welcher FISH-Proben der Subtelomerregionen aller Chromosomen enthält (Brown *et al.*, 2001). Mit diesem Mix wurden sowohl 61 NK-AML Fälle als auch 8 AML-Fälle mit Trisomie 8 als alleinige Aberration untersucht. Das Ergebnis zeigte in drei der NK-AML Fälle Aberrationen in Form von zwei Translokationen (t(5;11)(q35;p15.5) sowie t(11;19)(q23;p13)), was einer Häufigkeit von 4,9 % in NK-AML entspricht. Die Suche nach dem Bruchpunkt in der t(5;11)(q35;p15.5) ergab ein Splitsignal im *NUP98* Gen, das bei ca. 3700 kb (Abstand zum Telomer 11p) lokalisiert ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden keine Translokationen im Chromosom 11 nachgewiesen. Es konnten nur Deletionen oder Duplikationen beschrieben werden. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2003 von Casas *et al.*, in der ebenfalls 40 NK-AML Fälle mit FISH-Sonden nach der t(5;11)(q35;p15.5) untersucht wurden, konnte in keinem der Fälle diese Veränderung nachgewiesen werden. Die Frequenz der Aberrationen in der Studie von Brown ist deutlich geringer als die hier im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse. Die bei Brown verwendeten FISH-Sonden befinden sich mit Ausnahme von 5p jeweils in einem Abstand zum Telomer von maximal 500 kb (Knight *et al.*, 2000). Der Abstand der Sonde in 5p zum Telomer war nicht bekannt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Subtelomersonden haben mit Ausnahme von 11p einen maximalen Abstand von 400 kb. Die Sonden aus 11p sind mindestens 670 kb vom Telomerbereich entfernt lokalisiert. Dies zeigt, dass die Sonden in beiden Untersuchungen eine ähnliche Entfernung zum Telomerbereich hatten. Der Unterschied liegt in der verwendeten Anzahl der Sonden und der untersuchten Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden außer in 5p mindestens drei BACs aus einer Region kombiniert und in einer Farbe markiert. Dies verstärkte das FISH-Signal, so dass auch eine Auswertung der nicht proliferierenden Zellen möglich war. Dies führte zu einer erhöhten Detektion von aberranten Klonen, die wahrscheinlich während der Kultivierung nicht in Teilung gegangen waren und deswegen in den Metaphasen nicht nachweisbar waren. Weiterhin wurden bei der Auswertung der Interphasekerne pro Sonde mindestens 150 Kerne ausgewertet. Dies erhöhte die Wahrscheinlichkeit der Detektion von Aberrationen, die nur in einer geringen Prozentzahl der Zellen

auftraten. So wurde in dieser Arbeit ein Großteil der Aberrationen in nur ca. 10 % der Interphasekerne nachgewiesen. Auch wenn die Zellen mit Aberrationen während der Kultivierung in Teilung gehen, besteht die Möglichkeit, dass Aberrationen auf Grund der geringen Anzahl an Zellen mit Aberrationen nicht detektiert oder als Einzelzellaberrationen gewertet werden.

#### 4.1.7 Detektierte Aberrationen als prognoserelevante Marker?

Die detektierten Aberrationen in den Subtelomerbereichen sind außer in 5p und 9p Loci, in denen CNVs publiziert wurden. Weiterhin sind in den Subtelomerbereichen der Chromosomen 9 und 11 interchromosomale, segmentale Duplikationen vorhanden. Segmentale Duplikationen sind Regionen, die von stark konservierten, homologen Wiederholungssequenzen flankiert sind, welche diese Regionen für nichtallelische homologe Rekombination, die zu Duplikationen, Deletionen oder Inversionen führt, prädisponiert (Sharp *et al.*, 2005). Somit sind diese Regionen in den AML-Fällen, in denen Aberrationen detektiert wurden, für Veränderungen prädisponiert. Wie bereits erwähnt, lassen sich die Aberrationen nur für die Deletion in 12p mit einem AML-Subtyp verbinden. In 4 der 5 Fälle wurde eine Veränderung in diesem Bereich bei Fällen mit AML-M2 gefunden. Die anderen Aberrationen zeigten sich unabhängig vom Subtyp, Alter oder auch der Blastenzahl des Patienten. Des Weiteren wurden sie in 50 % der Fälle nur in den Interphasekernen nachgewiesen, d.h. in den nicht proliferierenden Zellen. Es liegen keine klinischen Daten zu den analysierten Patienten vor, so dass kein Rückschluss der Aberration auf die Prognose gezogen werden kann.

#### 4.1.8 Zusammenfassung

Zusammenfassend haben die Untersuchungen mittels mMCB sowie lokusspezifischen Proben der Subtelomerbereiche gezeigt, dass in ca. 60 % der NK-AML Fälle chromosomale Aberrationen mit FISH nachweisbar waren. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen Anzahl der Blasten und der Häufigkeit der detektierten Aberrationen. Weiterhin konnten die Aberrationen keiner bestimmten FAB-Klassifikation zugeordnet werden. Ausnahme bildete die Deletion in 12p, die bei vier Fällen in einer AML-M2 nachgewiesen wurde. Mit 25-30 % aller AML-Fälle ist dieser Subtyp neben der AML-M4 der häufigste Vertreter (siehe Tab. 36 im Anhang). Auf Grund der geringen Anzahl an Fällen mit einer Deletion in 12p lassen sich jedoch keine Rückschlüsse darauf ziehen, ob diese Aberration spezifisch für eine AML-M2 ist. In den analysierten Fällen mit Trisomie 8 konnten weder mittels mMCB noch lokusspezifischen Proben Aberrationen detektiert werden.

## 4.2 pod-FISH: eine neue FISH-Methode zur Unterscheidung homologer Chromosomen

### 4.2.1 Etablierung der Methode

Für die neue Methode pod-FISH (Weise *et al.*, 2008) (siehe 3.3) wurden DNA-Sonden in Form von BACs aus polymorphen, genomischen Regionen, so genannten CNV-Regionen (siehe 1.5.2), verwendet. Die Idee war, aufgrund der Verluste und Zugewinne an DNA in den polymorphen Regionen, könnten die BAC-Klone in ihrer Signalstärke variieren und würden so eine erstmalige Unterscheidung der homologen Chromosomen auf Einzelzellniveau anhand der Signalstärken ermöglichen. Ca. 11 % der BAC-Klone zeigten Signalunterschiede zwischen den homologen Chromosomen. Ferner wurde beobachtet, dass eine hohe Anzahl der BACs (ca. 35 %) Kreuzhybridisierungen auf dem gleichen und/oder anderen Chromosomen aufwiesen (siehe Tab. 38 im Anhang). Sharp *et al.* postulierten 2005, dass segmentale Duplikationen (siehe 1.4.2) als Auslöser für CNVs gelten könnten. Segmentale Duplikationen sind Regionen mit einer hohen Rate an Rekombination, die eine Erklärung für die mit FISH nachgewiesenen Kreuzhybridisierungen der BACs aus den CNV-Regionen sein könnten. Ferner ist es möglich, dass diese Regionen auf Grund ihrer Kreuzhybridisierungen bei array-CGH oder weiteren molekulargenetischen Methoden, die zur Detektion von CNVs verwendet wurden, als polymorph erschienen. Die Validierung der pod-FISH Methode wurde an verschiedenen Fällen durchgeführt. So erfolgte beispielsweise ein Test an Suspensionen von klinisch unauffälligen Probanden. Dieser zeigte, dass BACs mit Signalunterschieden zwischen den homologen Chromosomen in den verschiedenen Suspensionen nachgewiesen werden konnten. Weiterhin wurde gezeigt, dass die informativen BACs sich in den jeweiligen Suspensionen unterschieden. Dies deutet darauf hin, dass die Signalunterschiede individuumsspezifisch und genau wie die CNVs in jedem Probanden unterschiedlich sind (z.B. Sebat *et al.*, 2004; Redon *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmalig der Nachweis der Herkunft aberranter Chromosomen auf Einzelzellniveau. Dieser Nachweis ist gegenwärtig zytogenetisch nur möglich, wenn die homologen Chromosomen anhand von Polymorphismen zu unterscheiden sind (siehe 1.5.1) oder molekulargegentisch in Form von Mikrosatelliten- oder Methylierungs-PCR möglich, wo jedoch Zellgemische zur Bestimmung herangezogen werden (Strachan und Read, 2005). Die Kombination der BAC-Klone zu gesamtgenomischen SONDENSSETS (siehe 3.3.2.6 sowie 3.3.2.8) zeigte, dass die Signalstärken der BAC-Klone weder in den Lymphozytensuspensionen noch im Knochenmark innerhalb der Metaphasen einer Suspension konstant waren. Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Anzahl der BACs liegen. Es wäre möglich, dass die hohe Anzahl der BACs dazu führt, dass sich diese bei der Hybridisierung gegenseitig räumlich behindern und dadurch keine effiziente Bindung der Sonden an die Ziel-DNA stattfinden kann. Weiterhin könnte die hohe Anzahl der BACs, die in einer Farbe markiert waren, zu einer schlechteren Aufnahmequalität der Signale führen. Die stärkeren Signale verhindern eine notwendige, länger andauernde Aufnahme der schwächeren Signale, so dass diese kaum erkennbar sind. Eine durchgeführte manuelle Verlängerung der Aufnahmezeit

zur Lösung dieser Fragestellung führte zu keiner Verbesserung der Signalstärken. Die neu entwickelte Methode des pod-FISH sollte mit einer unabhängigen, molekularbiologischen Methode bestätigt werden. Es stellte sich die Frage, wenn ein Signalunterschied zwischen homologen Chromosomen auftrat, ob sich dann die dazu gehörige quantitative CNV-Änderung nachweisen ließe. Bei der ersten hierzu gewählten Methode handelte es sich um den Nachweis von CNVs mit SNP-Arrays (z.B. Redon *et al.*, 2006; Komura *et al.*, 2006). Hierfür wurden aus zwei Lymphozytensuspensionen, die vorher mit pod-FISH BACs auf Signalunterschiede getestet wurden, die DNA isoliert und mit einem SNP-Array analysiert. Die anschließende Auswertung zeigte, dass kein Polymorphismus in den betreffenden Regionen nachweisbar war. Der Grund hierfür lag in der Auflösung des Arrays, die 1,5 Mb betrug und somit nur sehr große CNVs sichtbar machen konnte. Die zweite Möglichkeit zur Lösung der Fragestellung war die Analyse von Spermienzellen. In diesen haploiden Zellen sollte nach informativen BACs gesucht werden, die zwischen den einzelnen Zellen Signalunterschiede aufwiesen. Da die Spermien haploid sind, ist keine Trennung der homologen Chromosomen notwendig. Die Idee war, Spermien mit schwachen Signalen sowie Spermien mit starken Signalen getrennt mittels Mikrosezierung zu sammeln und anschließend den Polymorphismus durch eine quantitative PCR nachzuweisen. Jedoch reichte die Auflösung des Fluoreszenzmikroskops für die Mikrosezierung nicht aus, um definitive Aussagen über die Signalstärken treffen zu können. Als dritte Variante wurden willkürlich ausgewählte Fälle mit Polymorphismen im Heterochromatin des Chromosoms 16 untersucht. In diesen Fällen war es möglich, die homologen Chromosomen anhand des Polymorphismus zu unterscheiden. Die Idee war, nach informativen BACs zu suchen, anschließend die Chromosomen 16 über eine Mikrosezierung zu trennen und den CNV durch eine RealTime-PCR nachzuweisen. Allerdings zeigte die RealTime-PCR der mikrosezierten Chromosomen keine Amplifikation. Auch eine weitere Reamplifizierung zur Erhöhung der Konzentration der Ausgangs-DNA führte zu keinem Ergebnis während der RealTime-PCR. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in der zu geringen Ausgangskonzentration der DNA für die RealTime-PCR. Es wurden pro homologen Chromosom jeweils 5 Chromosomen gesammelt. Dabei war es nicht möglich, mehr Chromosomen zu sammeln, da neben den Chromosomen 16 auch die Chromosomen 7 als Kontrolle mikroseziert wurden und die Mikrosezierung zeitlich sehr intensiv war.

#### 4.2.2 Somatische Rekombinationen in CNV-Regionen

Bei den vorangegangenen Auswertungen der pod-FISH BAC-Klone zeigte sich folgender Sachverhalt. Einige BACs wiesen in den analysierten Fällen, unabhängig vom verwendeten Material, immer gleich starke Signale auf. Häufig waren bei 20 analysierten Metaphasen ein bis zwei Metaphasen mit Signalunterschieden, welche auf die Hybridisierungsqualität zurückgeführt werden konnten, vorhanden. Weiterhin wurden BACs beschrieben, die sich als informativ erwiesen, also Signalunterschiede zeigten, die dann auch in fast 100 % der Metaphasen auftraten. Jedoch zeigte die Auswertung auch BACs, deren Signalunterschiede innerhalb einer Suspension variierten. So war es oftmals der Fall, dass diese BACs in 50 % der Metaphasen

gleiche und in 50 % der Metaphasen unterschiedlich starke Signale aufwiesen. Diese Unterschiede konnten ebenfalls im Fall N beschrieben werden, der auf Grund einer isodisomen Zelllinie keine Signalunterschiede aufweisen sollte. Diese BACs wurden für die weiteren Auswertungen nicht mit einbezogen.

Eine Erklärung für diese Unterschiede könnte sein, dass bei den Untersuchungen an Zellgemischen gearbeitet wurde. So besteht beispielsweise eine Lymphozytensuspension aus verschiedenen Zellen, die alle unterschiedliche Oberflächenmarker sowie verschiedene Aufgaben besitzen. Es könnte möglich sein, dass innerhalb der verschiedenen Zelltypen somatische Rekombinationen auftreten. CNVs sind häufig mit segmentalen Duplikationen assoziiert, die als Auslöser für Rekombinationen beschrieben sind (Sharp *et al.*, 2005). Am Institut für Humangenetik und Anthropologie in Jena läuft zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit eine Studie, welche die Signalunterschiede in verschiedenen Geweben und folglich verschiedenen Zelltypen, wie beispielsweise Fibroblasten und Haarwurzeln einzelner Individuen, untersucht. Bruder *et al.* publizierten 2008 eine Studie, in der 19 eineiige Zwillingspaare nach CNV-Regionen untersucht wurden. Es konnten CNV-Regionen beschrieben werden, die in den Zwillingen unterschiedlich auftraten und teilweise nur in 15 % der untersuchten Zellen sichtbar waren. Da die Untersuchung an DNA von Zwillingen erfolgte, sind die unterschiedlichen CNV-Regionen auf somatische Rekombinationen zurückzuführen. Ein weiterer Hinweis darauf war das Vorhandensein dieser CNVs in weniger als 100 % aller Zellen. Eine andere Studie untersuchte Wiederholungssequenzen in der DNA von gesunden, nicht verwandten Individuen, die zu Inversionen führen könnten (Flores *et al.*, 2007). Es zeigte sich, dass genomische Veränderungen in einer hohen Frequenz in somatischen Zellen auftreten können. Weiterhin konnte beschrieben werden, dass diese Veränderungen häufiger bei Erwachsenen als bei neugeborenen Kindern auftraten. Auch diese Ergebnisse geben einen Hinweis für das Auftreten somatischer Rekombinationen, die während der Embryogenese anfangen und auch nach der Geburt sich weiterhin vollziehen. Darüber hinaus wurde 2006 eine Publikation veröffentlicht, die sich mit Deletionen im *Alpha-Globin* Gen auf dem Chromosom 16 beschäftigte (Lam und Jeffreys; 2006). Hier konnte gezeigt werden, dass somatische Deletionen in diesem Gen sowohl in Spermien als auch im Blut desselben Probanden spontan auftreten können und dass diese somatischen Mosaiken in beiden Materialien mit der gleichen Häufigkeit vorhanden waren.

Diese Publikationen sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind ein Hinweis auf das Vorhandensein von somatischen Rekombinationen, die in CNV-Regionen erfolgen und in Form von Mosaiken in den verschiedenen Zelltypen vorliegen können. CNVs, die in der Keimbahn rekombinieren, sind in 100 % der Zellen vorhanden. Die somatisch entstehenden CNVs liegen in weniger als 100 % der Zellen vor und sind deshalb mit den molekulargenetischen Methoden zur Detektion von CNVs, wie beispielsweise BAC-Arrays, schwieriger nachzuweisen (Bruder *et al.*, 2008). Da diese *de novo* CNVs nicht in 100 % der Zellen vorliegen, könnte dies eine Erklärung für die Signalunterschiede, welche innerhalb der pod-FISH BACs auftraten, sein. Hierfür benötigt es weitere Studien, die sich mit der Detektion dieser CNVs beschäftigen sowie neue Methoden, die CNVs in Mosaiken effizienter detektieren können. Dabei sollten idealerweise verschiedene Gewebe eines Probanden

untersucht werden. Weiterhin zeigte die Auswertung der pod-FISH BACs, dass die Signale im Knochenmark der untersuchten AML-Fälle konstanter waren als in den Lymphozyten. Es ist bekannt, dass AML eine klonale Erkrankung ist, d.h. die Tumorzellen entwickeln sich aus einer Zelle und sollten folglich genetisch identisch sein. Ferner ist es bei Tumorerkrankungen der Fall, dass neben den primären genetischen Veränderungen auch sekundäre Veränderungen auftreten können. Hier stellt sich die Frage, ob diese sekundären Veränderungen auch in CNV-Regionen auftreten.

#### 4.2.3 Zusammenfassung pod-FISH

Die neu etablierte Methode des pod-FISH ermöglichte erstmalig die Unterscheidung homologer Chromosomen auf Einzelzellniveau. Sie wurde eingesetzt bei der Bestimmung der Herkunft aberranter Chromosomen auf Einzelzellniveau. Weiterhin wurde mit dieser Methode eine parentale Präferenz des rekombinierten Chromosoms 7 bei der Prozessierung der T-Lymphozyten ausgeschlossen. Außerdem zeigte diese Methode, dass möglicherweise somatische Rekombinationen in den Zellen erfolgen, die in weiterführenden Studien näher untersucht werden sollten.

### 4.3 T-Zell Rezeptorregion

Der T-Zell Rezeptor ist ein membrangebundener Proteinkomplex in T-Lymphozyten, der für die Erkennung von Antigenen verantwortlich ist und während der Entwicklung der Lymphozyten im Thymus exprimiert wird. Sein extrazellulärer Teil wird aus einer Alpha- und einer Beta-Kette gebildet (Clevers *et al.*, 1988). Seltener (in ca. 1-3 % der Zellen) wird eine Lambda- sowie Delta-Kette exprimiert (Brenner *et al.*, 1986). Diese Ketten sind jeweils über Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden ein Heterodimer, welches die Membran durchspannt. Die Gene für die Alpha- und die Betakette des Rezeptors sind in 14q11.2 bzw. 7q34 lokalisiert. Diese Gene setzen sich aus V-(*variable*), D-(*diversity*) und J-(*joining*) sowie C-(*constant*) Gensegmenten zusammen, die im Verlauf der VDJ-Rekombination im Thymus assembliert werden (Strachan und Read, 2005). So setzt sich beispielsweise der ca. 685 kb große Beta-Rezeptorloкус in 7q34 aus 65 V-Gensegmenten im 5'-Bereich und 2 Clustern, bestehend aus D-, J- und C-Segmenten im 3'-Bereich zusammen (Rowen *et al.*, 1996). Während der VDJ-Rekombination bilden sich spezifische Kombinationen aus je einem V-, D- und J-Segment (Gene der Beta T-Zell Rezeptoren) oder je einem V- und J-Segment (Gene der Alpha T-Zell Rezeptoren), die zellspezifisch sind. Diese somatische Rekombination der T-Zell Rezeptorloci findet nur bei T-Lymphozyten statt, die sich aus Vorläuferzellen des Knochenmarks entwickeln. Diese Vorläuferzellen wandern über das Blut in den Thymus, wo sie proliferieren und sich zu T-Lymphozyten differenzieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden BAC-Klone als FISH-Sonden verwendet, die innerhalb oder angrenzend an den Alpha bzw. Beta T-Zell Rezeptorloкус lokalisiert waren. Diese BACs wurden auf verschiedene Zelltypen hybridisiert. Somit konnte erstmalig ein Nachweis der Rekombination auf Einzelzellniveau erfolgen. Die Auswertung der Hybridisierung auf einem Gemisch an T-Lymphozyten klinisch

unauffälliger Probanden zeigte für den Beta-Lokus auf Chromosom 7 ein Gemisch an Zellen mit zwei Signalen bzw. einem Signal. Drei der verwendeten BACs befanden sich in der variablen Region innerhalb des Lokus und wiesen in ca. 50 % der Zellen ein Signal auf. Dies bedeutet, dass das Chromosom ohne Signal die Rekombination durchlaufen hat und die komplette BAC-Sequenz oder Teile davon deletiert wurden. Das andere homologe Chromosom mit dem BAC-Signal zeigte in den Bereichen der BACs keine Deletion, so dass hier eine Rekombination ausgeschlossen werden kann. Sehr selten, in höchstens einer oder zwei der analysierten Metaphasen pro Proband, konnte kein Signal detektiert werden. Die erfolgreiche Hybridisierung in diesen Zellen konnte auf Grund der Kreuzhybridisierung des BACs RP11-1141E10 im Zentromerbereich von Chromosom 9 bestätigt werden. Diese Kreuzhybridisierung resultiert aus einer Duplikation und Translokation eines Bereiches der T-Zell Rezeptorgene von Chromosom 7 auf Chromosom 9 (Rowen *et al.*, 1996). Bezüglich der fehlenden Signale auf Chromosom 7 ist in der Literatur beschrieben, dass die Rekombination entweder am mütterlichen oder väterlichen Allel stattfindet (Prinzip der allelischen Exklusion) (Bergman, 1999). Eine Rekombination am zweiten Allel erfolgt nur dann, wenn das erste Allel beispielsweise durch eine Mutation nicht funktionsfähig ist. Dies könnte der Fall gewesen sein in den analysierten Zellen, die keine Signale auf dem Chromosom 7 zeigten. Die Auswertung der BACs, die sich innerhalb bzw. flankierend zum Alpha T-Zell Rezeptorlokus im Chromosom 14 befanden, lieferte etwas andere Ergebnisse im Vergleich zum Beta-Lokus. Die Metaphasen der klinisch unauffälligen Probanden wiesen in ca. 50 % ein oder zwei Signale der BACs auf, die sich innerhalb des Lokus in der variablen Region befanden. Jedoch war in diesem Fall die Anzahl der Metaphasen ohne Signale mit ca. 50 % deutlich höher als beim Beta-Lokus. Auch hier konnte die Hybridisierung auf Grund der Kreuzhybridisierung des BACs RP11-614K19 kontrolliert werden. Es ist bekannt, dass der Alpha-Rezeptorlokus nicht dem Prinzip der allelischen Exklusion folgt. Hier kann eine Rekombination beider Allele erfolgen, deren Bedeutung jedoch noch unklar ist (Elliott, 1998). Legt man die FISH-Ergebnisse dieser Arbeit zu Grunde, finde diese doppelte Rekombination möglicherweise in mindestens 50 % der Zellen statt. In einem weiteren Experiment wurde Material von Probanden gewählt, bei denen neben den T-Lymphozyten auch immortalisierte B-Lymphozyten zur Verfügung standen. Da den Prozess der Rekombination nur die T-Lymphozyten durchlaufen, konnten auch nur in diesen Zellen Deletionen nachgewiesen werden. Die B-Zellen wiesen immer Signale auf beiden homologen Chromosomen auf. Außerdem wurden die BACs des Chromosoms 7 auf weitere Materialien angewendet. So wurden neben Fruchtwasser und Knochenmark auch Spermienzellen untersucht. Da sich im Fruchtwasser hauptsächlich Hautfibroblasten sowie Zellen des Magen-Darm-Traktes und der Blase befanden, wurden die Signale auf beiden Chromosomen 7 nachgewiesen. Das gleiche Ergebnis zeigte sich beim Knochenmark. Hier besteht das Zellgemisch aus Zellen, die noch keine Rekombination im Thymus durchlaufen haben und somit auch keine Deletion aufweisen. Ebenso konnte in den Spermienzellen auf Grund ihrer Haploidie immer ein Signal auf Chromosom 7 beschrieben und somit die Deletion ausgeschlossen werden. Auch in diesem Fall ist die fehlende Prozessierung der Zellen im Thymus die Ursache für die nicht vorhandene Deletion. Weitere Hybridisierungen erfolgten mit



BACs der Chromosomen 7 und 14 auf Knochmarkproben zweier Fälle mit B-ALL sowie T-ALL. Da es sich um Zellen des Knochenmarks handelte, waren immer zwei Signale nachweisbar. In einem der beiden T-ALL Fälle war ebenfalls die Untersuchung der T-Lymphozyten möglich. In diesen Zellen wurden ebenfalls in allen Metaphasen zwei Signale nachgewiesen. Bei der akuten lymphatischen Leukämie sind die Vorläuferzellen der Lymphozyten betroffen, die sich anhäufen und keine somatische Rekombination im Thymus durchlaufen, so dass zwei Signale beider homologer Chromosomen sichtbar waren. Weiterhin wurde Nabelschnurblut aus verschiedenen Schwangerschaftswochen (18.-22.) untersucht. Die Hybridisierung der BACs des Chromosoms 7 zeigte im Vergleich zu den vorangegangenen T-Lymphozyten Analysen andere Ergebnisse. Etwa ein Drittel der Zellen wies eine Deletion der innerhalb des Rezeptors liegenden BACs auf. Ebenso wurden Deletionen beobachtet, in die erstmalig nur zwei oder auch nur einer der drei BACs involviert waren. Weiterhin zeigten ca. ein Drittel der Zellen keine Deletion. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist, dass die somatische Rekombination der Alpha- und Beta-Gensegmente auf den Chromosomen 7 und 14 beim Menschen etwa ab der 10. Schwangerschaftswoche erfolgt. Ab diesem Zeitpunkt entwickeln sich das Immunsystem und folglich auch die Immunabwehr in Form von Antikörpern. Das Repertoire an Antikörpern ist zu diesem Zeitpunkt noch geringer als in den weiteren Lebensstadien.

In weiteren Experimenten wurde im Rahmen der Arbeit erstmalig auf Einzelzellebene mit FISH-Sonden bestimmt, welches der homologen Chromosomen die Deletion trägt, also die somatische Rekombination während der Entwicklung der T-Lymphozyten durchlaufen hat. Hier stellte sich die Frage, ob es eine parentale Präferenz für die Rekombination gibt. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde die neu etablierte Methode des pod-FISH angewendet, mit der es möglich ist, homologe Chromosomen auf Einzelzellniveau zu unterscheiden. Die Ergebnisse der BACs im Chromosom 7 (Beta-Rezeptorlokus) zeigten, dass die Rekombination zufällig erfolgt und ungefähr im Verhältnis von 1:1 auf den maternalen sowie paternalen Chromosomen auftritt. Es erfolgt also keine parentale Präferenz für die Rekombination. Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden mit dem Einsatz einer MCB-Sonde, die auf Grund eines Polymorphismus bei dem Probanden ebenfalls eine Unterscheidung der homologen Chromosomen ermöglichte.

#### **4.4 Anwendung von pod-FISH bei AML-Fällen**

##### **4.4.1 Nachweis segmentaler UPDs bei NK-AML**

Die Beschreibung segmentaler UPDs (siehe 1.4.2) bei NK-AML erfolgten erstmals durch Raghavan *et al.* sowie Gorletta *et al.* im Jahr 2005. In beiden Publikationen wurde mit SNP-Arrays in ca. 10-20 % der untersuchten Fälle ein Verlust der Heterozygotie in Form segmentaler UPDs nachgewiesen. Diese UPDs traten in verschiedenen Chromosomen auf, konnten jedoch in beiden Publikationen in den Chromosomen 6, 9 und 13 beschrieben werden. Die Größen der UPDs variierten bei Raghavan *et al.* zwischen 16-113 Mb und bei Gorletta *et al.* zwischen 31-95 Mb. Die im Rahmen beider Studien verwendete Methode des SNP-Array hat den

Nachteil, dass nur Zellgemische untersucht werden können und die Tumore mindestens 80 % Blasten besitzen sollten, was die Auswahl der Fälle stark einschränkt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte mit Hilfe der pod-FISH Methode nach segmentalen UPDs in NK-AML Fällen mit einer geringeren Anzahl an Blasten gesucht werden. Der Nachweis dieser UPDs sollte anhand der Signalstärken der BACs auf Einzelzellniveau erfolgen. Liegt eine UPD vor, dann wären die Signalstärken in den Tumorzellen gleich. Andererseits könnte in den normalen Zellen ein Signalunterschied detektiert werden, wenn in diesem Bereich der BAC-Klon informativ wäre. Somit wäre mittels der Signalstärken eine Unterscheidung zwischen leukämischen und nicht leukämischen Zellen auf Einzelzellniveau möglich. Die Kontrolle des Erwerbs der segmentalen UPD könnte dann anhand von Proben des Patienten zum Zeitpunkt der Remission erfolgen. Zusätzlich wurden AML-Fälle mit Trisomie 8 ausgewählt, um auch hier nach segmentalen UPDs zu suchen. Die vorangegangenen Auswertungen der BACs auf klinisch unauffälligen Probanden zeigten bereits, dass informative BACs in ca. 10 % der Metaphasen Signalunterschiede zeigten. Ferner wurde immer wieder beobachtet, dass informative BACs nur in 50 % der Metaphasen einen Unterschied aufwiesen (siehe 4.2.1). Diese Signalunterschiede erschwerten auch die Auswertung der Leukämiefälle. Wurde ein Signalunterschied in beispielsweise 50 % der Zellen detektiert, dann konnten keine Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob dies auf Grund einer segmentalen UPD erfolgte oder ob die pod-FISH BACs in ihrer Signalstärke variierten. Weiterhin erwiesen sich die meisten BACs als nicht informativ, so dass nicht sicher auf das Vorhandensein einer UPD geschlossen werden konnte.

#### 4.4.2 Nachweis der Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 bei AML-Fällen mit Trisomie 8 und Detektion kryptischer Aberrationen

Trisomie 8 als alleinige Chromosomenaberration ist die am häufigsten auftretende Trisomie bei AML (Heim und Mitelman, 1995; Paulsson *et al.*, 2001). Sie kommt häufig als sekundäre Aberration bei AML-assoziierten Translokationen und Inversionen vor (Johansson *et al.*, 1994). Es gibt nur wenige Studien, die sich mit der elterlichen Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 beschäftigt haben. So sind gegenwärtig nur sechs Fälle publiziert, von denen in vier Fällen das zusätzliche Chromosom 8 maternaler und in zwei Fällen paternaler Herkunft war (Seghezzi *et al.*, 1996; Minelli *et al.*, 2001; Maserati *et al.*, 2004; Minelli *et al.*, 2004). Da die Bestimmung der Herkunft im Rahmen dieser Studien mit molekulargenetischen Methoden erfolgte, war die Analyse von einem Zellgemisch aus trisomen und nicht trisomen Zellen, wie es bei der AML häufig vorhanden ist, nicht möglich. Mit der Methode des pod-FISH konnte in dieser Arbeit in 8 von 13 Fällen die Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 bestimmt werden. Dabei erfolgte die Bestimmung auf Einzelzellniveau an Zellgemischen, wobei die Signalstärken zwischen trisomen und nicht trisomen Zellen verglichen wurden. Es zeigte sich, dass in diesen acht Fällen informative BACs des Chromosoms 8 vorhanden waren. Diese zeigten Signalunterschiede in Form von einem schwachen und einem starken Signal in den nicht trisomen Zellen und einem schwachen sowie zwei starken Signalen bzw. zwei schwachen und einem starken Signal in den trisomen Zellen, so dass hier ein

Rückschluss auf eine Verdoppelung von einem der Chromosomen 8 möglich war. In einem weiteren Schritt könnten nun die Zellen der Eltern der Patienten untersucht werden und anhand der Signalunterschiede die elterliche Herkunft des zusätzlichen Chromosoms 8 bestimmt werden.

Weiterhin konnten kryptische Veränderungen bei AML-Fällen mit Trisomie 8 beobachtet werden. Zwei der analysierten Fälle zeigten eine kryptische Insertion. Der BAC RP11-459H21, der in 8p21.3 lokalisiert ist, wies ein Signal in 8q21 auf. Eine perizentrische Inversion kann ausgeschlossen werden, da die BACs zwischen 8p21.3 und 8q21 nicht invertiert waren. Diese Insertion wurde sowohl in den trisomen als auch in den nicht trisomen Zellen beobachtet und deutet auf eine Aberration, die nicht in Zusammenhang mit der Leukämie steht und möglicherweise schon in der Keimbahn der Patienten vorhanden sein könnte, hin. Weiterhin wurden bei vier Patienten kryptische Deletionen beschrieben. Im Fall 2 wies der BAC RP11-96G1 aus 8q21.2 in den nicht trisomen Zellen eine Deletion auf. Diese Deletion war jedoch in den trisomen Zellen nicht nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in den Fällen 3 und 5. Hier waren der BAC RP11-21H16 aus 8q24.22 bzw. der BAC RP11-366J3 aus 8p22 deletiert. Auch diese Deletion war nur in den nicht trisomen Zellen nachweisbar. Im Fall 2 war die Deletion in allen Metaphasen ohne zusätzliches Chromosom 8 sichtbar. Dies deutet, ähnlich wie die oben beschriebene kryptische Translokation, auf keine leukämische Veränderung hin. Die Deletionen im Fall 3 und 5 hingegen wurden in den nicht trisomen Zellen nachgewiesen, da jedoch nicht in allen Zellen. Folglich könnte die Deletion als leukämischer Marker gewertet werden, die möglicherweise als Primäraberration auftrat und auf Grund ihrer Größe zytogenetisch nicht sichtbar war. Die Trisomie 8 wäre dann eine sekundäre Aberration und nicht entscheidend für das Entstehen der Leukämie. In dem Bereich des deletierten BACs im Fall 3 ist gegenwärtig nur ein hypothetisches Gen bekannt. Die Deletion im Fall 5 umfasst einen Bereich, in dem nur ein Gen, das *Zeta-Sarcoglycan* Gen, vorhanden ist. Das Gen mit Funktionen im Zytoskelett wurde laut Datenbank noch nicht im Zusammenhang mit Tumoren beschrieben. Im Fall 5 wurde eine weitere Deletion beobachtet. Diese betrifft den BAC RP11-21H16, der bereits im Fall 2 in den nicht trisomen Zellen deletiert vorlag. Im Fall 5 zeigte dieser BAC eine Deletion in 9 von 12 analysierten trisomen Zellen. Die nicht trisomen Zellen wiesen keine Deletion auf. Da diese kryptische Deletion ausschließlich in den trisomen Zellen vorhanden ist, dort aber nur in 75 % der Zellen, ist hier möglicherweise eine sekundäre Aberration erfolgt. Wie bereits erwähnt, ist in der Sequenz dieses BACs nur ein hypothetisches Gen bekannt. Im Fall 7 wurde ebenfalls eine Deletion beschrieben. Diese zeigte sich im BAC RP11-122L4 aus 8p11.23 und konnte in allen Zellen nachgewiesen werden. Somit handelt es sich um eine konstitutionelle Aberration und ein direkter Zusammenhang zur Leukämieentstehung ist ausgeschlossen. Von den Patienten mit Trisomie 8 standen keine Lymphozytensuspensionen zur Verfügung, die als Kontrolle der Aberrationen hätten verwendet werden können.

Bisher wurden nur vereinzelt FISH-Studien publiziert, die sich mit der Suche nach kryptischen Aberrationen bei AML mit Trisomie 8 befassen. So wurde in nur einem Fall, der eine schlechte Morphologie der Chromosomen aufwies, eine t(7;14) nachgewiesen (Mohr *et al.*, 2000). Brown *et al.* untersuchten einen AML-Fall mit

Trisomie 8 auf kryptische Aberrationen in den Subtelomerbereichen, die nicht nachweisbar waren (2001). Weiterhin zeigte eine Publikation von Dyson *et al.*, dass in einem Trisomie 8 Fall eine kryptische Insertion des *MLL* Gens im Chromosom 9 erfolgte (2003). Die Suche nach genetischen Veränderungen in Trisomie 8 Fällen hingegen war erfolgreicher. So konnten somatische Punktmutationen in leukämieassoziierten Genen nachgewiesen werden (Paulsson und Johansson, 2007). Paulsson und Mitarbeiter publizierten ebenfalls 2006 eine Studie, in der sie zehn AML-Fälle mit Trisomie 8 als alleinige Aberration mit array-CGH (siehe 1.3.5) untersuchten. In vier der Fälle konnten intrachromosomale Imbalancen, die Duplikationen und hemizygote Deletionen beinhalteten, nachgewiesen werden. Diese Veränderungen wurden auf verschiedenen Chromosomen gefunden, eine davon in 8q21.3. Diese Studie sowie die gefundenen Aberrationen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass kryptische Aberrationen in Trisomie 8 Fällen häufig vorkommen und dass die Trisomie 8 als die alleinige Aberration nicht immer die primäre genetische Veränderung darstellt.

Weiterhin war im Rahmen dieser Arbeit bei der Auswertung der Signalstärken der BACs aufgefallen, dass die BACs in 8p23 häufig Signalunterschiede aufwiesen. Diese Region beinhaltet Cluster von segmental duplizierten olfaktorischen Rezeptorgen. Hierbei handelt es sich um Inversionsvarianten, die in 8p23 und 4p16 mit einer Häufigkeit von 12,5 % bzw. 26 % in der normalen Bevölkerung auftreten (Giglio *et al.*, 2001 und 2002). Diese Inversionen zählen zu den submikroskopischen Strukturvarianten und sind für ihre häufigen Veränderungen beschrieben. Weiterhin befindet sich in 8p23 das Defensin Cluster, eine der am besten untersuchten CNV-Regionen (Groth *et al.*, 2008). Dieses Gencluster ist hoch polymorph und bereits mit Krebsentstehung in Verbindung gebracht wurden.

#### **4.5 Detektierte Aberrationen bei AML-Fällen und deren Bedeutung**

Etwa die Hälfte aller AML-Fälle zeigt zytogenetisch einen normalen Karyotyp (z.B. Bacher *et al.*, 2006; Mrózek *et al.*, 2004). Verschiedene FISH-Studien, wie beispielsweise mit gesamtgenomischen Sonden (Zhang *et al.*, 2000) und verschiedenen lokusspezifischen Sonden (z.B. Cuneo *et al.*, 2002; Fröhling *et al.*, 2002; Klaus *et al.*, 2004) führten zu einer Detektion von Aberrationen in maximal 3-10 % der Fälle. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mit der FISH-Methode des mMCB ähnliche Ergebnisse erzielt. Diese gesamtgenomische Untersuchung führte zur Detektion von chromosomalen Veränderungen in 6 % der Fälle. Weiterhin wurden lokusspezifische Subtelomerproben eingesetzt, mit denen sowohl die Metaphasen wie beim mMCB als auch zusätzlich die Interphasekerne analysierbar waren. Es zeigten sich Aberrationen in ca. 60 % der NK-AML Fälle.

Es gibt mehrere Gründe, warum Aberrationen bei NK-AML Fällen zytogenetisch nicht sichtbar sind. So gibt es einen Anteil von AML-Fällen, die numerische Aberrationen nur in den Interphasekernen zeigen, wie z.B. publiziert für AML mit Trisomie 8 und 11 (Jenkins *et al.*, 1992; Cuneo *et al.*, 1995; Fröhling *et al.*, 2002). Auch die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in ca. 50 % der Fälle mit detektierten Aberrationen diese nur in den Interphasekernen nachweisbar und in den Metaphasen keine Auffälligkeiten zu finden waren. Weiterhin könnte es sich um Veränderungen

handeln, die innerhalb einer zytogenetischen Bande vorliegen und daher nicht sichtbar sind. Zur Detektion solcher Veränderungen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine gesamtgenomische Untersuchung der Chromosomen von NK-AML Fällen mit Hilfe des mMCB durchgeführt. Es zeigte sich, dass diese Veränderungen nicht detektierbar waren und der zytogenetisch normale Karyotyp in 94 % der Fälle bestätigt werden konnte. Schließlich ist es möglich, dass kryptische Veränderungen auftreten, die zyogenetisch nicht nachweisbar sind. Ferner erschwert eine schlechte Morphologie der Knochenmarkchromosomen die zytogenetische Routineanalyse. Kryptische Veränderungen konnten im Rahmen dieser Arbeit als Veränderungen der Subtelomerbereiche entweder in Form von Deletionen oder Duplikationen, die eine Größe von mindestens 300 kb aufwiesen, beschrieben werden. Da diese kryptischen Veränderungen auf Grund ihrer Größe zytogenetisch nicht sichtbar sind, können sie im Rahmen der Routineanalyse der NK-AML Fälle nicht detektiert werden.

In zwei der untersuchten Fälle mit Veränderungen in den Subtelomerbereichen waren bekannte Protoonkogene deletiert (*HRAS* und *RAS3*). Protoonkogene stimulieren in normalen Zellen die Zellproliferation. Sie können durch Amplifizierungen, Mutationen, chromosomalen Umstrukturierungen, die zu einem neuen Gen führen oder Translokationen in einen Bereich mit aktiver Transkription aktiviert werden (Strachan und Read, 2005). Da diese Veränderungen dominant auftreten und im Allgemeinen nur ein Allel betreffen, wäre es bei im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Fällen möglich, dass es auf Grund der Deletion eines Allels eines Protoonkogens und einer gleichzeitigen Mutation in dem anderen Allel (die möglicherweise bereits existierte) es zur Aktivierung gekommen sein könnte, die dann zur Entstehung der Leukämie geführt hätte.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass die deletierten Gene in den Subtelomerbereichen als Tumorsuppressorgene (TSG) fungieren. Diese Gene kontrollieren oder hemmen die normale Zellteilung. Ihr Funktionsverlust tritt erst dann auf, wenn beide Allele defekt sind. Dies kann beispielsweise auf Grund von Deletionen oder Mutationen erfolgen, dann werden sie als Klasse I TSG bezeichnet. Weiterhin kann die Expression der TSG durch weitere Faktoren verhindert werden (Klasse II TSG). So führt beispielsweise eine epigenetische Veränderung in Form einer Methylierung des Promotors des Gens zum Funktionsverlust. Sind beide Allele eines Gens verändert, dann verliert das TSG seine Funktion, und es kann zum unkontrollierten Wachstum der Zellen kommen. Der Verlust der Funktion der TSG in der Tumorgenese wurde bereits 1971 als „Two-hit“ Modell von Knudson definiert. Dieses Modell besagt, dass ein initiales Mutationseignis zur Geninaktivierung auf einem Allel führt. Diese Veränderung gefolgt von entweder einem Verlust der Heterozygotie während der Zellteilung oder mitotischer Rekombination oder einer Deletion bedingt die Inaktivierung des zweiten Allels. Dies ist dann der Schritt der Umwandlung einer normalen Zelle in eine Tumorzelle. Falls die erste Mutation nicht somatisch erfolgte, sondern bereits in der Keimbahn vererbt wurde, tragen diese Individuen bereits eine Prädisposition für eine Tumorentstehung. Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Aberrationen bei NK-AML lassen keine Rückschlüsse zu, ob diese Aberration als primäre genetische Veränderung zu sehen ist oder nur eine sekundäre Veränderung darstellt.

Weiterhin ist zu beachten, dass eine Monosomie entsteht, wenn die Deletion ein Gen betrifft, das durch Prägung (*Genomic Imprinting*) zum aktiven Gen wurde. Das Gen ist jedoch funktionell komplett abgeschaltet, da das noch vorhandene Gen durch Prägung inaktiviert wurde. Dies wurde beispielsweise beim Prader-Willi-Syndrom beschrieben, bei dem eine Deletion eines Bereichs des väterlichen Chromosoms 15 (15q11-15q13) erfolgt (Horsthemke *et al.*, 2006). Betrifft die Deletion ein nicht geprägtes Gen, so hat sie in der Regel keine klinische Auswirkung, da das verbleibende Allel noch aktiv ist.

#### 4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit neu entwickelte Methode pod-FISH ermöglicht erstmals die Unterscheidung homologer Chromosomen auf Einzelzellniveau. Sie kann eingesetzt werden bei UPD-Analysen in Metaphasen sowie bei der Bestimmung der parentalen Herkunft aberranter Chromosomen. Da einige BAC-Klone schwankende Signalstärken innerhalb der Metaphasen eines Probanden zeigen, können weiterführende Untersuchungen klären, ob diese auf Grund somatischer Rekombinationen entstehen.

Bei der Analyse von AML-Fällen wurde gezeigt, dass ein Einsatz von mMCB in der zytogenetischen Routinediagnostik nicht sinnvoll wäre. Nur in 6 % der Fälle wurden Aberrationen beschrieben, die sich in den Subtelomerbereichen der Chromosomen 5, 9, 11, 12 und 13 befanden. Weiterhin konnten lokusspezifische Subtelomerproben Deletionen oder Duplikationen in 60 % der Fälle aufgezeigt werden. Diese Veränderungen wurden sowohl in den proliferierenden als auch den nicht proliferierenden Zellen nachgewiesen. Fortführende Studien könnten klären, welche Funktion die deletierten oder duplizierten Gene bei der Entstehung der Leukämie innehaben. Möglicherweise wäre für die Diagnostik ein Einsatz eines Subtelomer-mixes für alle Chromosomen sinnvoll. Jedoch ist die Auswertung dieses Mixes sehr zeitaufwendig und wäre nur in den proliferierenden Zellen möglich. Somit würden Veränderungen in den Zellen, die nicht in Teilung gehen, unentdeckt bleiben. FISH bietet gegenüber molekulargenetischen Methoden den Vorteil, dass Veränderungen in den Einzelzellen nachgewiesen werden können, die dort möglicherweise nur in einer geringen Frequenz vorliegen. Somit spielt die Anzahl der Blasten keine Rolle. Ferner wurde im Rahmen dieser Arbeit eine limitierte Anzahl an lokusspezifischen Proben verwendet. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere kryptische Veränderungen oder terminale Deletionen bei NK-AML sowie Trisomie 8 Fällen vorhanden sind. Da die zytogenetischen Aberrationen als wichtigste Prognosefaktoren gelten, sollten weitere molekulargenetische Untersuchungen Veränderungen erfolgen. Mehrere genetische Veränderungen bei NK-AML mit prognostischer Bedeutung wurden bereits entdeckt, wie beispielsweise die interne Tandemduplikation des *FLT3* Gens und Mutationen im *NPM1* Gen. Weiterhin konnten Genexpressionsanalysen zeigen, dass NK-AML Fälle anhand ihrer Expressionsmuster in prognostische Subgruppen unterteilt werden können. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass NK-AML Fälle neben dem zytogenetischen Gebiet auch auf dem molekularen Gebiet sehr heterogen sind und dass genetische Veränderungen neue molekulare Subgruppen definieren können. Möglicherweise

sind diese molekularen Veränderungen ebenfalls als Ziele für neue therapeutische Ansätze brauchbar.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit bei AML-Fällen mit Trisomie 8 kryptische Aberrationen in Form von Insertionen entdeckt. Diese stellen möglicherweise primäre genetische Veränderungen dar, so dass der Zugewinn des Chromosoms 8 nur als sekundäre Aberration zu werten ist. Die Trisomie 8 Fälle werden der intermediären Prognosegruppe zugeordnet und lassen auf Grund der fehlenden zytogenetischen Marker keine individuelle Therapieplanung zu. Weiterführende Studien könnten zu einer möglichen Einteilung dieser Fälle anhand ihrer Aberrationen beitragen. Auch hierfür bietet FISH den Vorteil der Einzelzellanalysen und der Detektion von Aberrationen in einer geringen Anzahl der Zellen.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im ersten Teil eine Identifizierung und Charakterisierung kryptischer Aberrationen bei akuten myeloischen Leukämien zu liefern. Hierzu wurde eine umfassende Charakterisierung von 31 AML-Fällen mit zytogenetisch unauffälligem Karyotyp sowie 6 AML-Fällen mit Trisomie 8 als alleinige Aberration mit den neuesten molekularzytogenetischen Methoden durchgeführt. Die Auswertung dieser Fälle nach Hybridisierung mit mMCB zeigte in den proliferierenden Zellen in keinem der AML Trisomie 8 Fälle Veränderungen. In den NK-AML Fällen wurden in 6 % der Fälle Aberrationen in Form von kryptischen Deletionen in den Subtelomerbereichen der Chromosomen 2 und 5 nachgewiesen. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein routinemäßiger Einsatz von mMCB in der Diagnostik nicht sinnvoll wäre, da nur in einer geringen Anzahl der Fälle Veränderungen nachgewiesen werden konnten. In den sich anschließenden FISH-Experimenten mit lokusspezifischen Proben der Subtelomerbereiche der Chromosomen 5, 9, 11, 12 und 13 wurden erstmalig sowohl die proliferierenden Zellen als auch die nicht proliferierenden Zellen nach Veränderungen untersucht. In 50 % der NK-AML Fälle wurden kryptische Deletionen bzw. Duplikationen nachgewiesen. Bei den betroffenen Genen in diesen Bereich handelte es sich teilweise um tumorassoziierte Gene, wie z.B. das *HRAS* Gen, das als Protoonkogen an einer Vielzahl von Tumoren beteiligt ist. Die Veränderungen zeigten sich unabhängig vom AML-Subtyp sowie dem Alter des Patienten. Nur für die Aberration im Subtelomerbereich vom Chromosom 12 konnte eine Korrelation zum Subtyp nachgewiesen werden, da diese Aberration bei 4 von 5 Fällen bei Patienten mit einer AML-M2 gefunden wurde. Weiterhin kann nicht nachgewiesen werden, dass diese Aberrationen als primäre genetische Veränderungen vorliegen und somit entscheidend für die Entstehung der Leukämie sein können. In den Trisomie 8 Fällen konnten mit Hilfe der Subtelomersonden keine Veränderungen beschrieben werden. Da die Trisomie 8 häufig als sekundäre Aberration auftritt und die Prognose der Krankheit nicht beeinflusst, wurde in diesen Fällen mit dem zusätzlichen Chromosom 8 als alleinige Aberration nach einer primären genetischen Veränderung gesucht. Sowohl mit mMCB als auch mit lokusspezifischen FISH-Sonden aus den Subtelomerbereichen ließen sich keine Aberrationen nachweisen.

Da Tumore als Zellgemische von gesunden und tumorassoziierten Zellen vorliegen, wurde im zweiten Teil der Arbeit geklärt, ob es leukämische Marker in NK-AML Fällen bzw. Trisomie 8 Fällen gibt, mit Hilfe derer die Zellen unterschieden werden können. Hierfür wurde eine neue FISH-Methode, das pod-FISH, etabliert, mit der es erstmals möglich war, anhand von Signalstärken spezifischer FISH-Sonden homologe Chromosomen auf Einzelzellniveau zu unterscheiden. Die unterschiedlichen Signalstärken beruhten auf FISH-Sonden aus CNV-Regionen, die individuumsspezifische Polymorphismen zeigten. Auf Grund nur weniger informativer FISH-Sonden sowie schwankender Signalstärken konnten im Rahmen der untersuchten Fälle keine eindeutig identifizierbaren leukämischen Marker definiert werden. Aus denselben Gründen war es mit dieser Methode nicht möglich, segmentale UPDs, welche in 20 % der NK-AML Fälle bereits beschrieben wurden, nachzuweisen. Weiterhin konnte die Methode des pod-FISH erfolgreich bei



Trisomie 8 Fällen angewendet werden. Hier konnte erstmalig auf Einzelzellniveau gezeigt werden, dass das zusätzliche Chromosom 8 auf einer Verdoppelung eines der anderen Chromosomen 8 beruht und keine UPD in Form einer Isodisomie vorliegt. Weiterhin wurden erstmalig kryptische Aberrationen identifiziert, die als primäre genetische Veränderung in den Zellen vorliegen und somit prognoserelevant sein könnten.

## II Literaturverzeichnis

**Arnold J** (1879) Über feinere Strukturen der Zelle unter normalen und pathologischen Bedingungen. *Virchows Arch Path Anat* 77: 181-206

**Arrighi FE, Hsu TC** (1971) Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* 10: 81-86

**Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, Maierhofer C, Langer S, Bolzer A, Reichman J, Schuffenhauer S, Speicher MR** (2000) An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. *Am J Hum Genet* 66: 1684-1688

**Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S** (2006) Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 107: 3847-3853

**Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, Caligiuri MA, Carroll AJ, Vardiman JW, Powell BL, Allen SL, Moore JO, Larson RA, Kolitz JE, de la Chapelle A, Bloomfield CD** (2003) BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 101: 1613-1618

**Baldus CD, Thiede C, Soucek S, Bloomfield CD, Thiel E, Ehninger G** (2006) BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol* 24: 790-797

**Barbacid M** (1987) Ras genes. *Ann Rev Biochem* 56: 779-827

**Bates GP, Wainwright BJ, Williamson R, Brown SD** (1986) Microdissection of and microcloning from the short arm of human chromosome 2. *Mol Cell Biol* 6: 3826-3830

**Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C** (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103: 620-625

**Bergman Y** (1999) Allelic exclusion in B and T lymphopoiesis. *Semin Immunol* 11: 319-328

**Bhatt S, Moradkhani K, Mrasek K, Puechberty J, Lefort G, Lespinasse J, Sarda P, Liehr T, Hamamah S, Pellestor F** (2007) Breakpoint characterization: a new approach for segregation analysis of paracentric inversion in human sperm. *Mol Hum Reprod* 13:751-756

**Boissel N**, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, Terre C, Tigaud I, Castaigne S, Raffoux E, De Botton S, Fenaux P, Dombret H, Preudhomme C (2005) Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 106: 3618-3620

**Bos, JL** (1989) Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research* 49: 4682-4689

**Bottomley JR**, Reynolds JS, Lockyer PJ, Cullen PJ (1998) Structural and functional analysis of the putative inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptors GAP1 (IP4BP) and GAP1 (m). *Biochem Biophys Res Commun* 250: 143-149

**Boveri T** (1903) Über die Konstitution der chromatischen Kernsubstanz. Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft, 13. Jahresversammlung zu Würzburg. Korschelt E, Hrsg. Leipzig: Wilhelm Engelmann. S. 10-33

**Brenner MB**, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, Seidman JG, Ip S, Rosen F, Krangel MS (1986) Identification of a putative second T-Cell receptor. *Nature* 332: 145-149

**Brown J**, Saracoglu K, Uhrig S, Speicher MR, Eils R, Kearney L (2001) Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Nat Med* 7: 497-501

**Brown J**, Jawad M, Twigg SR, Saracoglu K, Sauerbrey A, Thomas AE, Eils R, Harbott J, Kearney L (2002) A cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in 2 children with acute myeloid leukemia with apparently normal karyotypes, identified by a multiplex fluorescence in situ hybridization telomere assay. *Blood* 99: 2526-2531

**Bruder CE**, Piotrowski A, Gijsbers AA, Andersson R, Erickson S, de Stahl TD, Menzel U, Sandgren J, von Tell D, Poplawski A, Crowley M, Crasto C, Partridge EC, Tiwari H, Allison DB, Komorowski J, van Ommen GJ, Boomsma DI, Pedersen NL, den Dunnen JT, Wirdefeldt K, Dumanski JP (2008) Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet* 3: 763-771

**Byrd JC**, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PRK, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD (2002) Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100: 4325-4336

**Caligiuri MA**, Schichman SA, Strout MP, Mrózek K, Baer MR, Frankel SR, Barcos M, Herzig GP, Croce CM, Bloomfield CD (1994) Molecular rearrangement of the ALL-1 gene in acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 chromosomal translocations. *Cancer Res* 54: 370-373

**Carter NP** (2007) Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat Genet* 39: 16-21

**Casas S**, Aventín A, Nomdedéu J, Sierra J (2003) Cryptic t(5;11)(q35;p15.5) in adult de novo acute myelocytic leukemia with normal karyotype. *Cancer Genet Cytogenet* 145: 183

**Casas S**, Aventin A, Fuentes F, Vallespi T, Granada I, Carrió A, Angel Martinez-Climent J, Solé F, Teixidó M, Bernués M, Duarte J, Maria Hernández J, Brunet S, Dolors Coll M, Sierra J (2004) Genetic diagnosis by comparative genomic hybridization in adult de novo acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 153: 16-25

**Caspersson T**, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Modest EJ, Simonsson E, Wagh U, Zech L (1968) Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res* 49: 219-222

**Caspersson T**, Zech L, Johansson C (1970a) Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 60: 315-319

**Caspersson T**, Zech L, Johansson C (1970b) Analysis of human metaphase chromosomes set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp Cell Res* 62: 490-492

**Cerveira N**, Correia C, Bizarro S, Pinto C, Lisboa S, Mariz JM, Marques M, Teixeira MR (2006) SEPT2 is a new fusion partner of MLL in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q37;q23). *Oncogene* 25: 6147-6152

**Christ O**, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Buske C (2007) Pathogenese und Biologie der akuten myeloischen Leukämie. *Med Klin* 102: 290-295

**Chudoba I**, Henn TK, Senger G, Claussen U (1997) Comparative genomic hybridization using DOP-PCR amplified DNA from small number of nuclei. *Cs Pediat* 52: 519-552

**Chudoba I**, Plesch A, Lörch T, Lemke J, Claussen U, Senger G (1999) High resolution multicolorbanding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 84: 156-160

**Claussen U**, Michel S, Mühlig P, Westermann M, Grummt UW, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T (2002) Demystifying chromosome preparation and the implications for a concept of chromosome condensation during mitosis. *Cytogenet Genome Res* 98: 136-146

**Clevers H**, Alarcon B, Wileman T, Terhorst C (1988) The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu Rev Immunol* 6: 629-662

**Craig JM, Bickmore WA** (1994) The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nature Genet* 7: 376-382

**Cuneo A**, Ferrant A, Michaux JL, Boogaerts M, Demuynck H, van Orshoven A, Criel A, Stul M, Dal Cin P, Hernandez J (1995) Cytogenetic profile of minimally differentiated (FAB M0) acute myeloid leukemia: correlation with clinicobiologic findings. *Blood* 85: 3688-3694

**Cuneo A**, Bigoni R, Roberti MG, Bardi A, Rigolin GM, Piva N, Mancini M, Nanni M, Alimena G, Mecucci C, Matteucci C, La Starza R, Bernasconi P, Cavigliano P, Genini E, Zaccaria A, Testoni N, Carboni C, Castoldi G (1998) Detection and monitoring of trisomy 8 by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia: a multicentric study. *Haematologica* 83: 21-26

**Cuneo A**, Bigoni R, Cavazzini F, Bardi A, Roberti MG, Agostini P, Tammiso E, Ciccone N, Mancini M, Nanni M, De Cuia R, Divona M, La Starza R, Crescenzi B, Testoni N, Rege CG, Mecucci C, Lo CF, Saglio G, Castoldi G (2002) Incidence and significance of cryptic chromosome aberrations detected by fluorescence in situ hybridization in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Leukemia* 16: 1745-1751

**Dalley CD**, Neat MJ, Foot NJ, BurrIDGE M, Byrne L, Amess JA, Rohatiner AZ, Lister A, Young BD, Lillington DM (2002) Comparative genomic hybridization and multiplex-fluorescence in situ hybridization: an appraisal in elderly patients with acute myelogenous leukemia. *Hematol J* 3: 290-298

**de The H**, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A (1991) The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66: 675-684

**Döhner K**, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, Döhner H (2002) Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 20: 3254-3261

**Döhner K**, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, Bullinger L, Fröhling S, Döhner H (2005) Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 106: 3740-3746

**Dutrillaux B** (1973) Nouveau systeme de marquage chromosomique: Les bands T. *Chromosoma* 41: 395-402

**Dutrillaux B, Lejeune J** (1971) Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *LR Acad Sci Paris* 272: 2638-2640

**Dyson MJ**, Talley PJ, Reilly JT, Stevenson D, Parsons E, Tighe J (2003) Detection of cryptic MLL insertions using a commercial dual-color fluorescence in situ hybridization probe. *Cancer Genet Cytogenet* 147: 81-83

**Eichler EE** (2001) Recent duplication, domain accretion and the dynamic mutation of the human genome. *Trends Genet* 17: 661-669

**Elliott JI** (1998) Selection of dual Valpha T Cells. *Eur J Immunol* 28: 2115-2123

**Estey E, Döhner H** (2006) Acute myeloid leukemia. *Lancet* 368: 1894-1907

**Falini B**, Mason DY (2002) Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood* 99: 409-426

**Falini B**, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 352: 254-266

**Feuk L**, Carson AR, Scherer SW (2006) Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7: 85-97

**Filipowicz W** (2000) Imprinted expression of small nucleolar RNAs in the brain: time for RNomics. *Proc Nat Acad Sci USA* 97: 14035-14037

**Fitzgibbon J**, Smith LL, Raghavan M, Smith ML, Debernardi S, Skoulakis S, Lillington D, Lister TA, Young BD (2005) Association between acquired uniparental disomy and homozygous gene mutation in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65: 9152-9154

**Flores M**, Morales L, Gonzaga-Jauregui C, Domínguez- Vidaña R, Zepeda C, Yañez O, Gutiérrez M, Lemus T, Valle D, Avila MC, Blanco D, Medina-Ruiz S, Meza K, Ayala E, García D, Bustos P, González V, Girard L, Tusie-Luna T, Dávila G, Palacios R (2007) Recurrent DNA inversion rearrangements in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 6099-6106

**Fonatsch C, Krömer E** (2005) Tumorzytogenetik. *Med Wochenschr* 11-12: 281-288

**Ford CE, Hamerton JL** (1956) The chromosomes of man. *Nature* 178: 1020-1023

**Ford CE**, Miller OJ, Polani PE, de Almeida JC, Briggs JH (1959) A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis Turner Syndrome. *Lancet* 1: 711

**Fröhling S**, Skelin S, Liebisch C, Scholl C, Schlenk RF, Döhner H, Döhner K (2002) Comparison of cytogenetic and molecular cytogenetic detection of chromosome abnormalities in 240 consecutive adult patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 20: 2480-2485

**Fröhling S**, Kayser S, Mayer C, Miller S, Wieland C, Skelin S, Schlenk RF, Döhner H, Döhner K (2005) Diagnostic value of fluorescence *in situ* hybridization for the detection of genomic aberrations in older patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 90: 194-199

**Gallagher RC**, Pils B, Albalwi M, Francke U (2002) Evidence for the role of PWCR1/HBII-85 C/D box small nucleolar RNAs in Prader-Willi syndrome. *Genet* 71: 669-678

**Gerhard DS**, Kawasaki ES, Bancroft FC, Szabo P (1981) Localization of a unique gene by direct hybridization *in situ*. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3755-3759

**Giglio S**, Broman KW, Matsumoto N, Calvari V, Gimelli G, Neumann T, Ohashi H, Voullaire L, Larizza D, Giorda R, Weber JL, Ledbetter DH, Zuffardi O (2001) Olfactory receptor-gene clusters, genomic-inversion polymorphisms, and common chromosome rearrangements. *Am J Hum Genet* 4: 874-883

**Giglio S**, Calvari V, Gregato G, Gimelli G, Camanini S, Giorda R, Ragusa A, Gueneri S, Selicorni A, Stumm M, Tonnies H, Ventura M, Zollino M, Neri G, Barber J, Wicczorek D, Rocchi M, Zuffardi O (2002) Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. *Am J Hum Genet* 2: 276-285

**Goddard AD**, Borrow J, Freemont PS, Solomon E (1991) Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* 254: 1371-1374

**Gorletta TA**, Gasparini P, D'Elios MM, Trubia M, Pelicci PG, Di Fiore PP (2005) Frequent loss of heterozygosity without loss of genetic material in acute myeloid leukemia with a normal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 44: 334-337

**Griggs BL**, Ladd S, Saul RA, DuPont BR, Srivastava AK (2008) Dedicator of cytokinesis 8 is disrupted in two patients with mental retardation and developmental disabilities. *Genomics* 91: 195-202

**Grimwade D**, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A, Goldstone A (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 92: 2322-2333

**Grimwade D**, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett A, Goldstone A (2001) The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukaemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 98: 1312-1320

**Gross M**, Starke H, Trifonov V, Claussen U, Liehr T, Weise A (2006) A molecular cytogenetic study of chromosome evolution in chimpanzee. *Cytogenet Genome Res* 112: 67-75

**Groth M**, Szafranski K, Taudien S, Huse K, Mueller O, Rosenstiel P, Nygren AO, Schreiber S, Birkenmeier G, Platzer M (2008) High-resolution mapping of the 8p23.1 beta-defensin cluster reveals strictly concordant copy number variation of all genes. *Hum Mutat Epub*

**Haferlach T**, Bacher U, Kohlmann A, Schnittger S, Kern W, Haferlach C (2006) Microarray-Genexpressionsanalyse in der Leukämiediagnostik. *Medizinische Klinik* 101: 908-914

**Harper M, Saunders G** (1981) Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma* 83: 431-439

**Heim S, Mitelmann F** (1995) Acute myeloid leukemia. *Cancer Cytogenet* New York: Wiley-Liss, 69-140

**Heilmeyer B**, Buske C, Spiekermann K, Bohlander S, Feuring-Buske M, Hiddemann W, Braess J (2007) Diagnostik, Klassifikation und Prognosefaktoren der akuten myeloischen Leukämie. *Med Klinik* 102: 296-308

**Heller A**, Chudoba I, Bleck C, Senger G, Claussen U, Liehr T (2000) Microdissection based comparative genomic hybridization analysis (micro-CGH) of secondary acute myelogenous leukemias. *Int J Oncol* 16: 461-468

**Heller A**, Brecevic L, Glaser M, Loncarevic IF, Gebhart E, Claussen U, Liehr T (2003) Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a comprehensive molecular cytogenetic analysis reveals no cryptic aberrations. *Cancer Genet Cytogenet* 140: 66-69

**Hliscs R**, Mühlig P, Claussen U (1997) The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 76: 167-171



**Hong CS**, Park BY, Saint-Jeannet JP (2007) The function of Dmrt genes in vertebrate development: it is not just about sex. *Dev Biol* 310: 1-9

**Horsthemke B**, Buiting K (2006) Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res*. 113: 292-299

**lafrate AJ**, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C (2004) Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36: 949-951

**ISCN 2005** – An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Shaffer LG und Tommerup N, S. Karger Verlag, Basel 2005

**Jacobs PA** (1977) Human chromosome heteromorphisms (variants). *Prog Med Genet* 2: 251-274

**Jacobs PA, Strong JA** (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature* 183: 302-303

**Jacobs PA**, Browne C, Gregson N, Joyce C & White H (1992) Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet* 29: 103-108

**Jaju RJ**, Haas OA, Neat M, Harbott J, Saha V, Boulwood J, Brown JM, Pirc-Danoewinata H, Krings BW, Müller U, Morris SW, Wainscoat JS, Kearney L (1999) A new recurrent translocation, t(5;11)(q35;p15.5), associated with del(5q) in childhood acute myeloid leukemia. The UK Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). *Blood* 94: 773-780

**Jenkins RB**, Le Beau MM, Kraker WJ, Borell TJ, Stalboerger PG, Davis EM, Penland L, Fernald A, Espinosa R, Schaid DJ (1992) Fluorescence in situ hybridization: a sensitive method for for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. *Blood* 79: 3307-3315

**Johannson B**, Mertens F, Mitelman F (1994) Secondary chromosomal abnormalities in acute leukemias. *Leukemia* 8: 953-962

**John HL**, Birnstiel ML, Jones KW (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223: 912-913

**Kakizuka A**, Miller WH, Umesono K, Warrell RP, Frankel SR, Murty VV, Dmitrovsky E, Evans RM (1991) Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66: 663-674

**Kallioniemi A**, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman FM, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821

**Karst C**, Gross M, Haase D, Wedding U, Höffken K, Liehr T, Mkrtchyan H (2006) Novel cryptic chromosomal rearrangements detected in acute lymphoblastic leukemia detected by application of new multicolor fluorescent in situ hybridization approaches. *Int J Oncol* 28: 891-897

**Kaufmann E**, Knochel W (1996) Five years on the wing of fork head. *Mech Dev* 57: 3-20

**Kim SS**, Jung SC, Kim HJ, Moon HR, Lee JS (1999) Chromosome abnormalities in a referred population for suspected chromosomal aberrations: a report of 4117 cases. *J Korean Med Sci* 14: 373-376

**Klaus M**, Haferlach T, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Schoch C (2004) Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1 and M2: a study based on 652 cases analyzed with morphology, cytogenetics, and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 155: 47-56

**Knight SJ**, Lese CM, Precht KS, Kuc J, Ning Y, Lucas S, Regan R, Brenan M, Nicod A, Lawrie NM, Cardy DL, Nguyen H, Hudson TJ, Riethman HC, Ledbetter DH, Flint J (2000) An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am J Hum Genet* 67: 320-332

**Komura D**, Shen F, Ishikawa S, Fitch KR, Chen W, Zhang J, Liu G, Ihara S, Nakamura H, Hurles ME, Lee C, Scherer SW, Jones KW, Shapero MH, Huang J, Aburatani H (2006) Genome-wide detection of human copy number variations using high-density DNA oligonucleotide arrays. *Genome Res* 16: 1575-1584

**Knudson A** (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 4: 820-823

**Lam KW, Jeffreys AJ** (2006) Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of {alpha}-globin gene deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 24: 8921-8927

**Langer PR**, Waldrop AA, Ward DC (1981) Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotids: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 6633-6637

**Larsson C**, Hellqvist M, Pierrou S, White I, Enerback S, Carlsson P (1995) Chromosomal localization of six human forkhead genes, freac-1 (FKHL5), -3 (FKHL7), -4 (FKHL8), -5 (FKHL9), -6 (FKHL10), and -8 (FKHL12). *Genomics* 30: 464-469

**Lejeune J** (1959) Le mongolisme: Premier exemple d'aberration autosomique humaine. *Ann Genet Sem Hop* 1: 41-49

**Lemke J**, Chudoba I, Senger G, Stumm M, Loncarevic IF, Henry C, Zabel B, Claussen U (2001) Improved definition of chromosomal breakpoints using high-resolution multicolour banding. *Hum Genet* 108: 478-483

**Lemke J**, Claussen J, Michel S, Chudoba I, Muhlig P, Westermann M, Sperling K, Rubtsov N, Grummt UW, Ullmann P, Kromeyer-Hauschild K, Liehr T, Claussen U (2002) The DNA-based structure of human chromosome 5 in interphase. *Am J Hum Genet* 71:1051-1059

**Lengauer C**, Green ED, Cremer T (1992) Fluorescence in situ hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics* 13: 826-828

**Lengauer C**, Speicher MR, Popp S, Jauch A, Taniwaki M, Nagaraja R, Riethman HC, Donis-Keller H, D'Urso M, Schlessinger D, Cremer T (1993) Chromosomal bar codes produced by multicolour fluorescence in situ hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum Mol Genet* 2: 505-512

**Liehr T, Claussen U** (2002) Current developments in human molecular cytogenetic techniques. *Curr Mol Med* 2: 283-297

**Liehr T**, Heller A, Starke H, Claussen U (2002a) FISH banding methods: applications in research and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn* 2: 217-225

**Liehr T**, Weise A, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Weier HU, Claussen U (2002b) Multicolor chromosome banding (MCB) with YAC/BAC-based probes and region-specific microdissection DNA libraries. *Cytogenet Genome Res* 97: 43-50

**Liehr T**, Starke H, Heller A, Kosyakova N, Mrasek K, Gross M, Karst C, Steinhäuser U, Hunstig F, Fickelscher I, Kuechler A, Trifonov V, Romanenko SA, Weise A (2006) Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied to FISH-banding. *Cytogenet Genome Res* 114: 240-244

**Macina RA**, Negorev DG, Spais C, Ruthig LA, Hu XL, Riethman HC (1994) Sequence organization of the human chromosome 2q telomere. *Hum Mol Genet* 3:1847-1853

**Malcolm S**, Barton P, Murphy CS, Ferguson-Smith MA (1981) Chromosomal localization of a single copy gene by *in situ* hybridization: human beta globin genes on the short arm of chromosome 11. *Ann Hum Genet* 45: 135-141

**Martinez-Ramirez A**, Urioste M, Melchor L, Blesa D, Valle L, de Andrés SA, Kok K, Calasanz MJ, cigudosa JC, Beitez J (2005) Analysis of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes by high-resolution comparative genomic hybridization and subtelomeric CGH array. *Genes Chromosomes Cancer* 42: 287-298

**Maserati E**, Minelli A, Menna G, Cecchini MP, Bernardo ME, Rossi G, de Filippi P, Lo Curto F, Danesino C, Locatelli F, Pasquali F (2004) Familial myelodysplastic syndromes, monosomy 7/trisomy 8, and mutator effects. *Cancer Genet Cytogenet* 2: 155-158

**Minelli A**, Maserati E, Giudici G, Tosi S, Olivieri C, Bonvini L, de Filippi P, Biondi A, Lo Curto F, Pasquali F, Danesino C (2001) Familial partial monosomy 7 and myelodysplasia: different parental origin of the monosomy 7 suggests action of a mutator gene. *Cancer Genet Cytogenet* 2: 147-151

**Minelli A**, Maserati E, Rossi G, Bernardo ME, de Stefano P, Cecchini MP, Valli R, Albano V, Pierani P, Leszl A, Sainati L, Lo Curto F, Danesino C, Locatelli F, Pasquali F (2004) Familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia: genetic heterogeneity and progression to leukemia via acquisition of clonal chromosome anomalies. *Genes Chromosomes Cancer* 3: 165-171

**Mohr B**, Bornhäuser M, Thiede C, Schäkel U, Schaich M, Illmer T, Pascheberg U, Ehninger G (2000) Comparison of spectral karyotyping and conventional cytogenetics in 39 patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 6: 1031-1038

**Monajembashi S**, Cremer C, Cremer T, Wolfrum J, Greulich KO (1986) Microdissection of human chromosomes by a laser microbeam. *Exp Cell Res* 167: 262-265

**Mrasek K**, Heller A, Rubtsov N, Trifonov V, Starke H, Rocchi M, Claussen U, Liehr T (2001) Reconstruction of the female *Gorilla gorilla* karyotype by Zoo-FISH using 25 color FISH and multicolor banding (MCB). *Cytogenet Cell Genet* 93: 242-248

**Mrózek K**, Heinonen K, de la Chapelle A, Bloomfield CD (1997) Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Semin Oncol* 24: 17-31

**Mrózek K**, Heinonen K & Bloomfield CD (2001) Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 14: 19-47

**Mrózek K**, Heerema NA, Bloomfield CD (2004) Cytogenetics in acute leukaemia. *Blood Rev* 18: 115-136

**Müller S**, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg J (1998) Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* 33: 445-452

- Müller S**, Stanyon R, Finelli P, Archidiacono N, Wienberg J (2000) Molecular cytogenetic dissection of human chromosomes 3 and 21 evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 206-211
- Müller S**, **Wienberg J** (2001) "Bar-coding" primate chromosomes: molecular cytogenetic screening for the ancestral hominoid karyotype. *Hum Genet* 109: 85-94
- Murken J**, **Grimm T**, **Holinski E** (2006) Humangenetik. *Thieme Verlag, Stuttgart*
- Myatt SS**, **Lam EW** (2007) The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 847-859
- Nakata T**, Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Fujimori M, Yokoyama S, Ito K, Emi M (1999) Fusion of a novel gene, ELKS, to RET due to translocation t(10;12)(q11;p13) in a papillary thyroid carcinoma. *Genes Chrom Cancer* 25: 97-103
- Nakao M**, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, Sonoda Y, Fujimoto T, Misawa S (1996) Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 12: 1911-1918
- Nederlof PM**, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AH, Tanke HJ, Raap AK (1989) Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* 10: 20-27
- Nisole S**, Stoye JP, Saib A (2005) TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 3: 799-808
- Nowell PC**, **Hungerford DA** (1960) A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497
- Osoegawa K**, Mammosser AG, Wu C, Frengen E, Zeng C, de Jong PJ (2001) A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. *Genome Res* 11: 483-496
- Ottolenghi C**, **McElreavey K** (2000) Deletions of 9p and the quest for a conserved mechanism of sex determination. *Mol Genet Metab* 71: 397-404
- Pardue ML**, **Gall JG** (1969) Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 64: 600-604
- Paulsson K**, Sall T, Fioretos T, Mitelmann F, Johansson B (2001) The incidence of trisomy 8 as a sole chromosomal aberration in myeloid malignancies varies in relation to gender, age, prior iatrogenic genotoxic exposure, and morphology. *Cancer Genet Cytogenet* 130: 160-165

- Paulsson K**, Fioretos T, Strömbeck B, Mauritzson N, Tanke HJ, Johansson B (2003) Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in myelocytic malignancies: a multicolor and locus-specific fluorescence in situ hybridization study. *Cancer Genet Cytogenet* 140: 66-69
- Paulsson K**, Heidenblad M, Strömbeck B, Staaf J, Jönsson G, Borg A, Fioretos T, Johansson B (2006) High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia* 20: 840-846
- Paulsson K, Johansson B** (2007) Trisomy 8 as the sole chromosomal aberration in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Pathol Biol (Paris)* 55: 37-48
- Pedersen B, Jensen IM** (1991) Clinical and prognostic implications of chromosome 5q deletions: 96 high resolution studied patients. *Leukemia* 5: 566-573
- Pierrou S**, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerback S, Carlsson P (1994) Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *EMBO J* 13: 5002-5012
- Pinkel D, Albertson DG** (2005) Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 20: 331-354
- Pinkel D**, Straume D, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 2934-2938
- Pinkel D**, Segreaves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, Albertson DG (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 2: 207-211
- Raghavan M**, Lillington DM, Skoulakis S, Debernardi S, Chaplin T, Foot NJ, Lister TA, Young BD (2005) Genome-wide single nucleotide polymorphism analysis reveals frequent partial uniparental disomy due to somatic recombination in acute myeloid leukemias. *Cancer Res* 65: 375-378
- Rautenstrauss B, Liehr T** (2002) FISH Technology. *Springer Lab Manuals*
- Redon R**, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodward C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW, Hurles ME. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444: 444-454

**Rigby PW**, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* 133: 237-251

**Rowen L**, Koop BF, Hood L (1996) The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* 272: 1755-1762

**Rubtsov N**, Senger G, Kuzcera H, Neumann A, Kelbova C, Junker K, Beensen V, Claussen U (1996) Interstitial deletion of chromosome 6q: precise definition of the breakpoints by microdissection, DNA amplification, and reverse painting. *Hum Genet* 97: 705-709

**Saccone S**, De Sario A, Valle DG, Bernardi G (1992) The highest gene concentration in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4913-4917

**Saiki RK**, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA (1986) Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-Dqalpha DNA with allelespecific oligonucleotide. *Nature* 324: 163-166

**Saiki RK**, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermo-stable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491

**Schichman SA**, Caligiuri MA, Gu Y, Strout MP, Cabaani E, Bloomfield CD, Croce CM (1994) ALL-1 partial duplication in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6236-6239

**Schnittger S**, Schoch C, Dugas M (2002) Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukaemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100: 59-66

**Schnittger S**, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, Haferlach T, Hiddemann W, Falini B (2005) Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 106: 3733-3739

**Schoch C**, Haase D, Fonatsch C, Haferlach T, Löffler H, Schlegelberger B, Hossfeld DK, Becher R, Sauerland MC, Heinecke A, Wörmann B, Büchner T, Hiddemann W (1997) The significance of trisomy 8 in de novo acute myeloid leukemia: The accompanying chromosome aberrations determine the prognosis. *Br J Haematol* 99: 605-611

**Schröck E**, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, Ferguson-Smith MA, Ning Y, Ledbetter DH, Bar-Am I, Soenksen D, Garini Y, Ried T (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273: 494-497

**Seabright M**, (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 30: 971-972

**Sebat J**, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Maner S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A, Wigler M (2004) Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305: 525-528

**Seghezzi L**, Maserati E, Minelli A, Dellavecchia C, Addis P, Locatelli F, Angioni A, Balloni P, Miano C, Cavalli P, Danesino C, Pasquali F (1996) Constitutional trisomy 8 as first mutation in multistep carcinogenesis: clinical, cytogenetic, and molecular data on three cases. *Genes Chromosomes Cancer* 2: 94-101

**Senger G**, Chudoba I, Friedrich U, Tommerup N, Claussen U, Brondum-Nielsen K (1997) Prenatal diagnosis of a half cryptic translocation using chromosome microdissection. *Prenatal Diagnosis* 17: 369-374

**Senger G**, Chudoba I, Plesch A (1998) Multicolor-FISH – the identification of chromosome aberrations by 24 colors. *BIOforum* 9: 499-503

**Sharp AJ**, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Segraves R, Oseroff VV, Albertson DG, Pinkel D, Eichler EE (2005) Segmental duplications and Copy-Number Variation in the Human Genome. *Am J Hum Genet* 77: 78-88

**Shiah HS**, Kuo YY, Tang JL, Huang SY, Yao M, Tsaw W, Chen YC, Wang CH, Shen MC, Lin DT, Lin KH, Tien HF (2002) Clinical and biological implications of partial tandem duplication of the MLL gene in acute myeloid leukemia without chromosomal abnormalities at 11q23. *Leukemia* 16: 196-202

**Shizuya H**, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Smon M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA I in *Escherichia coli* using a F-factor based Vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8794-9797

**Slovak ML**, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, Paietta E, Willman CL, Head DR, Rowe JM, Forman SJ, Appelbaum FR (2000) Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96: 4075-4083



**Smith CM, Steitz JA** (1997) Sno storm in the nucleolus: new roles for myriad small RNPs. *Cell* 89: 669-672

**Speicher MR**, Ballard GS, Ward DC (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nature Genetics* 12: 368-375

**Strachan T, Read AP** (2005) Molekulare Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*

**Sutton WS** (1903) The chromosome inherity. *Biol Bull* 4: 231-248

**Takahashi K**, Kohno T, Ajima R, Sasaki H, Minna JD, Fujiwara T, Tanaka N, Yokota J (2006) Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. *Int J Oncol* 28: 321-328

**Takai D, Jones PA** (2004) Origins of bidirectional promoters: computational analysis of intergenic distance in the human genome. *Mol Biol Evol* 21: 463-467

**Tanke HJ**, de Haas RR, Sagner G, Ganzer M, van Gijlswijk RP (1998) Use of platinum coproporphyrin and delayed luminescence imaging to extend the number of targets FISH karyotyping. *Cytometry* 33: 453-459

**Telenius H**, Pelmear AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith MA, Nordenskjöld M, Pfragner R, Ponder BA (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOPPCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 257-263

**Tijo JH, Levan A** (1956) The chromosome number of a man. *Hereditas* 42: 1-6

**Tosi S**, Harbott J, Teigler-Schlegel A, Haas OA, Pirc-Danoewinata H, Harrison CJ, Biondi A, Cazzaniga G, Kempinski H, Scherer SW, Kearney L (2000) t(7;12)(q36;p13), a new recurrent translocation involving ETV6 in infant leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 29: 325-332

**Tyybäkinoja A**, Vilpo J, Knuutila S (2007) High resolution oligonucleotide array-CGH pinpoints genes involved in cryptic losses in chronic lymphocytic leukemia. *Cytogenet Genome Res* 118: 8-12

**van Zutven LJ**, Onen E, Velthuisen SC, van Drunen E, von Bergh AR, van den Heuvel-Eibrink MM, Veronese A, Mecucci C, Negrini M, de Greef GE, Beverloo HB (2006) Identification of NUP98 abnormalities in acute leukaemia: JARID1A (12p13) as a new partner gene. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 437-446

**Verma RS, Babu A** (1994) Human chromosomes: Principles and techniques. 2<sup>nd</sup> ed. McGraw Hill, Inc.

**Virchow R** (1845) Weisses Blut. Notizen aus dem Gebiete der Natur- und Heilkunde 36: 151-156

**Waldeyer W** (1888) Über Karyogenese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikrosk Anat* 32: 1

**Weimer J**, Kiechle M, Arnold N (2000) FISH-microdissection (FISH-MD) analysis of complex chromosome rearrangements. *Cytogenet Cell Genet* 88: 114-118

**Weise A**, Starke H, Heller A, Tonnies H, Volleth M, Stumm M, Gabriele S, Nietzel A, Claussen U, Liehr T (2002) Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterised by high resolution multicolour banding and region specific FISH probes. *J Med Genet* 39: 434-439

**Weise A**, Starke H, Heller A, Uwe C, Liehr T (2002a) Evidence for interphase DNA decondensation transverse to the chromosome axis: a multicolor banding analysis. *Int J Mol Med* 9: 359-361

**Weise A**, Heller A, Starke H, Mrasek K, Kuechler A, Pool-Zobel BL, Claussen U, Liehr T (2003) Multitude multicolor chromosome banding (mMCB) – a comprehensive one-step multicolor FISH banding method. *Cytogenet Genome Res* 103: 34-39

**Weise A**, Gross M, Mrasek K, Mkrtchyan H, Horsthemke B, Jonsrud C, von Eggeling F, Hinreiner S, Witthuhn V, Claussen U, Liehr T (2008) Parental-origin-determination FISH (pod-FISH) distinguishes homologues human chromosomes on a single cell level. *Int J Mol Med* 21:189-200

**Wolman SR**, Gundacker H, Appelbaum FR, Slovak ML (2002) Impact of trisomy 8 (+8) on clinical presentation, treatment response, and survival in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood* 100: 29-35

**Wong KK**, deLeeuw RJ, Dosanjh NS, Kimm LR, Cheng Z, Horsman DE, MacAuley C, Ng RT, Brown CJ, Eichler EE, Lam WL (2007) A comprehensive analysis of common copy-number variations in the human genome. *Am J Hum Genet* 80: 91-104

**Wu Q**, Tommerup N, Ming Wang S, Hansen L (2006) A novel primate specific gene, CEI, is located in the homeobox gene IRXA2 promoter in Homo sapiens. *Gene* 371: 167-173

**Yoneda-Kato N**, Look AT, Kirstein MN, Valentine MB, Raimondi SC, Cohen KJ, Carroll AJ, Morris SW (1996) The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* 12: 265-275

**Zhang FF**, Murata-Collins JL, Gaytan P, Forman SJ, Kopecky KJ, Willman CL, Appelbaum FR, Slovak ML (2000) Twenty-Four-Color Spectral Karyotyping Reveals Chromosome Aberrations in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 28: 318-328

### Internetdatenbanken

Folgende Internetdatenbanken wurden in dieser Arbeit verwendet (Stand April 2008):

**1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Version 36.3)**

NCBI steht für das „*National Center for Biotechnology Information*“ in Maryland, USA, das 1988 gegründet wurde. Diese Datenbank stellt den Zugang zu wichtigen DNA-, RNA- und Protein-Datenbanken her sowie zu einer Literaturdatenbank (Pubmed).

**2. <http://projects.tcag.ca/variation/>**

In dieser Datenbank sind alle publizierten strukturellen Varianten des menschlichen Genoms, die größer als 1 kb sind, aufgeführt. Gegenwärtig sind fast 30000 Einträge aus 46 Publikationen verfügbar.

**3. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>**

In dieser Datenbank werden publizierte Chromosomenaberrationen, die in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen stehen, aufgeführt. Sie wurde von Felix Mitelman und Mitarbeitern in Schweden entwickelt.

**4. <http://atlasgeneticsoncology.org//index.html>**

Der Atlas der Genetik und Zytogenetik in Onkologie und Hämatologie, erstellt aus publizierten Daten, ist frei zugänglich. Er zeigt Gene, zytogenetische Daten und klinische Beiträge zu Krebs an.

**5. <http://www.repeatmasker.org/>**

Der RepeatMasker ist ein Programm der Ensembl Datenbank und ermöglicht die Suche nach repetitiven Sequenzen in einer beliebigen DNA Sequenz.

**6. <http://genome.ucsc.edu/>**

In der Datenbank der Universität von Kalifornien in Santa Cruz, USA (UCSC) sind die Daten der Sequenzierung einer großen Anzahl an Genomen, inklusive dem menschlichen Genom, öffentlich zugänglich

**III Abkürzungen**

#	Chromosom
Ø	Durchschnitt
<	kleiner als
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
%	Prozent
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AC	Accession Code
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> , einmal destilliertes Wasser
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BES	BAC End Sequences
BIO	Biotin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCD-Kamera	charge coupled device-Kamera
CD4	cluster of differentiation 4
Cen	Zentromer
CGH	comparative genomic hybridization
cm	Centimeter
CML	chronisch myeloische Leukämie
CNP	copy number polymorphisms
CNV	copy number variations
Cot	Co=DNA Konzentration, t=Renaturierungszeit
Cy 5	Cyanine 5
Cy 5.5	Cyanine 5.5
DAPI	4',6'-Diamino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEAC	Diethylaminocoumarin
del	Deletion
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease

---

dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOP	degenerierter Oligonukleotid-Primer
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
<i>et al.</i>	und andere
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FAB	French-American-British
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
G-Bänderung	Giemsa-Bänderung
GTG	G-bands by Trypsin using Giemsa
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
inv	Inversion
ISCN	International System for Human Cytogenetic nomenclature
kb	kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	molare Masse
Mb	Megabasen
MCB	Multicolor banding
MDS	Myelodisplastisches Syndrom
M-FISH	Multiplex-FISH
mg	Miligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Milimeter
mM	milimolar
mMCB	multitude multicolor banding
mRNA	messengerRNA

---

N	normal (Chemie)
ng	nanogramm
NOR	nukleolusorganisierende Region
Nr.	Nummer
p-Arm	kurzer („petite“) Arm eines Chromosomes
PAC	P1 artificial chromosome
PBS	phosphate buffered saline
pcp	partial chromosome painting
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-konzentration
PHA	Phytohämagglutinin
Q	Quinacrin
q-Arm	langer („queue“) Arm eines Chromosomes
RNA	Ribonukleinsäure
RS	Referenzsignal
RT	Raumtemperatur
RX-FISH	cross species color banding
s	Sekunde
Sc	Subcentromer
SD	segmentale Duplikationen
SG	Spektrum Green
SO	Spektrum Orange
SSC	sodium saline citrat
SSCT	sodium saline citrat tween 20
SSCTM	sodium saline citrat tween 20 + Marvel
SKY	Spectral Karyotyping
St	Subtelomer
t	Translokation
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TIFF	Tagged Image File Format
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TSG	Tumorsuppressorgen

---

U	Uridin
UK	United Kingdom
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
wcp	whole chromosome painting
WHO	World Health Organization
YAC	Yeast Artificial Chromosome
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## IV Anhang

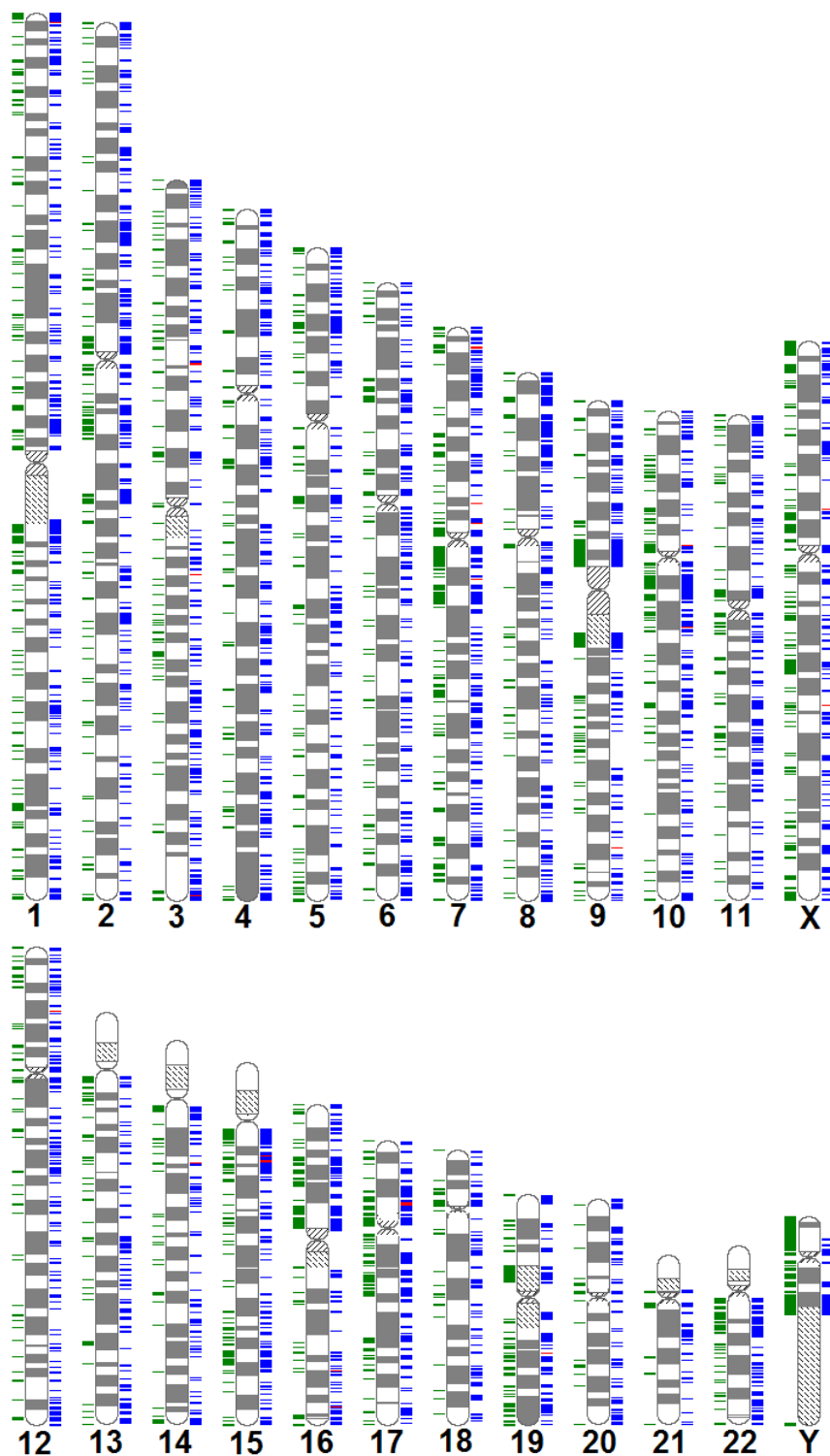
**Tab. 37: Definition der Subgruppen der akuten myeloischen Leukämie nach FAB** (<http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/e50/e5825/e5830/>, Stand April 2008). Es sind in der Tabelle von links nach rechts aufgelistet: die FAB-Klassifikation und die dazugehörigen Subtypen, die Morphologie, der Nachweis von Auerstäbchen (Morphologie) und der Myeloperoxidase (MPO, Zytochemie), die häufigsten zytogenetisch nachweisbaren Chromosomenaberrationen und die Häufigkeiten der Subtypen.

FAB	Subtyp	Morphologie	Auer- stäbe	MPO	UE	Zyto- genetik*	Häufigkeit
M 0	AML ohne Ausreifung	Myeloblasten ohne Granula	-	-**	-		< 5%
M 1	AML mit minimaler Ausreifung	Myeloblasten +/- Granula	+/-	+	-	t(9;22)	15 - 20%
M 2	AML mit Ausreifung	Myeloblasten mit Granula, einzelne Myelozyten	+	+	-	t(8;21)	25 - 30%
M 3	Akute Promyelozytenleukämie	Promyelozyten, deutlich granuliert	++	+	-	t(15;17)	5 - 10%
M 4	Akute myelomonozytäre Leukämie	Myeloblasten und Promyelozyten > 20%	+/-	+	+	Inv/del(16) bei M4eo	20 - 30 %
M 5a	Akute Monoblastenleukämie ohne Ausreifung	Große Monoblasten	-	-	+	t/del(11)	5%
M 5b	Akute Monoblastenleukämie mit Ausreifung	Monoblasten, Promonozyten und Monozyten; Monozytose im peripheren Blut	-	-	+	t(8;16)	5 - 10%
M 6	Akute Erythroleukämie	Megaloblastäre Erythropoese > 50%, Myeloblasten > 30%	+	+	+/-		5%
M 7	Akute Megakaryoblastenleukämie	Megakaryoblasten	-	-	+/-		5%

\*nur häufigste Abberationen

\*\*nur elektronenoptisch bzw. immunologisch nachweisbar +nachweisbar, ++stark nachweisbar, - nicht nachweisbar, +/-z.T. nachweisbar (modifiziert nach Bennett, 1985)

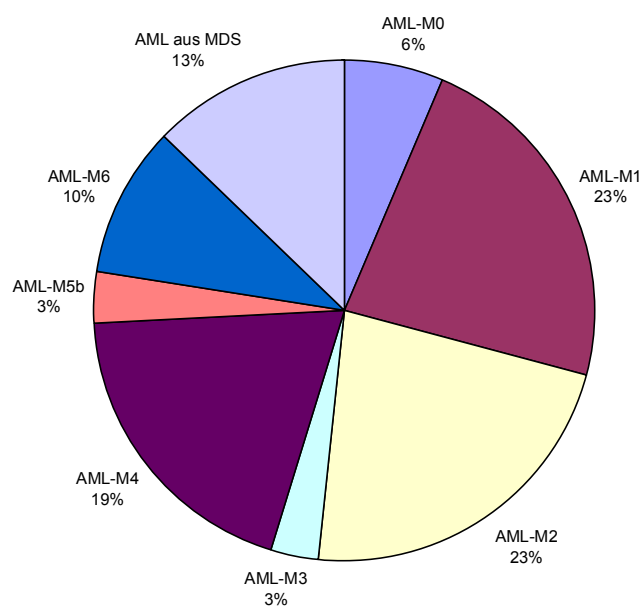




**Abb. 26: Zusammenfassung aller gegenwärtig publizierten CNVs (Database of genomic variants, <http://projects.tcag.ca/variation/genomeView.php>, Stand April 2008).** Die blauen Balken zeigen die chromosomale Lage von CNVs, die roten Balken weisen auf Inversionen hin und die grünen Balken stellen die Lage segmentaler Duplikationen dar.

**Tab. 38: Zusammenfassung aller untersuchten NK-AML Fälle.** Neben der Fallnummer und der Erstdiagnose (ED), sind das Geschlecht, das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie die Blastenzahl in Prozent angegeben. Ein “-“ bedeutet, dass bei diesen Patienten keine Daten für die Anzahl der Blasten vorlagen.

Fall	ED	Geschlecht	Alter bei ED	Blastenzahl [%]
1	AML-M6	männlich	57	54
2	AML-M2	männlich	62	63,2
3	AML-M2	männlich	71	84
4	AML-M1	männlich	36	88,5
5	AML-M6	männlich	62	80-90
6	AML-M1	männlich	68	20-25
7	AML-M4	weiblich	53	100
8	AML-M2	weiblich	74	39
9	AML-M2	männlich	43	28
10	AML aus MDS	männlich	55	16
11	AML-M4	männlich	64	91
12	AML aus MDS	männlich	34	13,6
13	AML-M5b	weiblich	48	10
14	AML-M2	männlich	78	82
15	AML aus MDS	männlich	65	20
16	AML-M2	männlich	48	30-35
17	AML-M1	männlich	54	81,3
18	AML-M1	weiblich	66	100
19	AML-M1	männlich	70	60
20	AML-M0	weiblich	62	-
21	AML-M1	männlich	38	-
22	AML-M4	männlich	65	-
23	AML-M4	männlich	58	90
24	AML aus MDS	weiblich	61	88
25	AML-M2	männlich	27	-
26	AML-M0	männlich	49	-
27	AML-M4	weiblich	41	50
28	AML-M1	männlich	44	80-90
29	AML-M4	männlich	43	100
30	AML-M6	weiblich	69	36
31	AML-M3	weiblich	37	-



**Abb. 27: Kreisdiagramm der prozentualen Verteilung der FAB-Klassifikation der untersuchten NK-AML Fälle.**

**Tab. 39: Zusammenfassung aller untersuchten AML-Fälle mit Trisomie 8.** Neben der Fallnummer und der Erstdiagnose (ED), sind das Geschlecht, das Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie der Karyotyp angegeben.

Fall	ED	Geschlecht	Alter bei ED	Karyotyp
1	AML-M1	weiblich	57	47,XX,+8 [7] / 46,XX [13]
2	AML aus MDS	weiblich	72	47,XX,+8 [3] / 46,XX [2]
3	AML aus MDS	weiblich	53	47,XX,+8 / 46,XX
4	AML aus MDS	männlich	56	kein Erstbefund
5	AML aus MDS	männlich	30	47,XX,+8 / 46,XX
6	AML aus MDS	männlich	69	47,XY,+8 [15] / 46,XY [6]
7	AML aus MDS	männlich	70	47,XY,+8 [2] / 46,XY [12]
8	AML	männlich	77	47,XY,+8
9	AML	weiblich	40	47,XX,+8 / 46,XX
10	AML-M2	weiblich	74	47,XX,+8
11	AML aus MDS	männlich	70	47,XY,+8
12	AML	weiblich	12	47,XX,+8 / 46,XX
13	AML aus MDS	weiblich	62	47,XX,+8 / 46,XX







## Fortsetzung Tab. 40

9	p24.3	0126	RP11-130C19	AL136979.16	615,148	812,246	-	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	-	gut	-----	-
9	p22.2	0128	RP11-340N12	AL354711.24	17,136,369	17,298,494	-	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	-	schwach	-----	+
9	p21.2	4616	RP11-802E2	AQ521338.1	26,324,440	26,465,736	17	4	95	22,1%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	+
9	p13.1	4625	RP11-104D19	AQ313283.1	41,037,972	41,143,437	0	12	95	12,6%	Wong et al. (2007)	+	schwach	9p11, 9p12, 9q12, 9q21.1	-
9	p12	0754	RP11 429F11	AQ550525	44,400,174	44,566,020	0	6	47	12,8%	Sharp et al. (2005)	+	sehr gut	4q31, 9p12-q11, 22q11	-
9	p12	2142	RP11-429F11	AQ550525	44,400,174	44,566,020	5	0	269	1,9%	Locke et al. (2006)	+	-	-	-
9	p12	0743	RP11-93P10	AQ312906.1	40,567,358	40,792,574	0	2	47	4,3%	Sharp et al. (2005)	+	sehr gut	9q13	-
9	p12	2132	RP11-93P10	AQ312906.1	40,567,358	40,792,574	4	0	269	1,5%	Locke et al. (2006)	+	-	-	-
9	p12	2818	RP11-708D13	AQ613609.1	42,050,602	43,951,965	15	21	270	13,3%	Redon et al. (2006)	+	-	-	-
9	p12	3769	RP11-366N18	AQ527527.1	38,557,168	45,935,928	-	216	270	80,0%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	9q13	-
9	p11.2	2149	RP11-316A6	AQ539585	67,379,003	67,565,003	4	3	269	2,6%	Locke et al. (2006)	+	gut	2q11.2, 9q21	-
9	p11.2	3769	RP11-433F23	AQ581745	38,557,168	45,935,928	-	216	270	80,0%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	7q11	-
9	p11.2	2137	RP11-433F23	AQ581745	38,557,168	45,935,928	4	0	269	1,5%	Locke et al. (2006)	+	-	-	-
9	p11.2	0752	RP11-343E15	AQ537614.1	44,347,339	44,499,026	0	6	47	12,8%	Sharp et al. (2005)	+	gut	9q13, acrocen	-
9	p11.2	2140	RP11-343E15	AQ537614.1	44,347,339	44,499,026	3	3	269	2,2%	Locke et al. (2006)	+	-	-	-
9	q12	2148	RP11-194F8	AQ413960	67,092,964	67,246,069	1	1	269	0,7%	Locke et al. (2006)	+	gut	9q22	-
9	q12	0756	RP11-452D2	AL591438.6	66,528,169	66,704,225	0	14	47	29,8%	Sharp et al. (2005)	+	gut	9p11.2, cen13, 14, 22	-
9	q12	5000	RP11-732L19	AQ068585.1	65,299,617	65,357,611	0	27	95	28,4%	Wong et al. (2007)	+	gut	9p12, 12q13, 20cen	+
9	q21.31	0165	RP11-79G7	AQ283445.1	79580	79757	0	1	-	-	-	-	sehr gut	9q12	-
9	q22.32	4645	RP11-519D15	-	93,913,597	94,121,564	18	0	95	18,9%	Wong et al. (2007)	+	sehr gut	-----	+/-
9	q31.1	2826	RP11-386L12	AL360018.13	101,717,505	101,862,268	3	70	270	27,0%	Redon et al. (2006)	-	gut	-----	-
9	q32	0131	RP11-9H12	B72555.1	112,905,346	113,012,508	1	1	55	3,6%	lafrate et al. (2004)	+	sehr gut	-----	-
9	q33.1	-	RP11-80J8	AQ284116.1	-	-	-	-	-	-	-	-	sehr gut	-----	-
9	q33.3	4656	RP11-809P3	AQ568234.1	126,680,409	126,909,104	10	1	95	11,6%	Wong et al. (2007)	-	gut	5cen, 9pter, Xcen	+
9	q34.2	4659	RP11-205O8	AL683798.22	134,425,214	134,447,480	1	10	95	11,6%	Wong et al. (2007)	-	schwach	-----	-
9	q34.2	4660	RP11-745L4	-	134,520,028	134,618,619	0	19	95	20,0%	Wong et al. (2007)	-	schwach	4q22, 4q32, 15qter	+
9	q34.3	3785	RP11-413M3	AQ592301.14	136,526,666	137,102,322	-	9	270	3,3%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	-----	-
9	q34.3	3787	RP11-424E7	AL591424.12	138,161,400	138,429,268	-	27	270	10,0%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	-----	-
9	q34.3	4663	RP11-769P5	-	137,219,963	137,336,762	0	12	95	12,6%	Wong et al. (2007)	-	-	3p, 4q, 5q, 6q	-
10	p15.3	4664	RP11-754A9	AQ451128.1	456,002	621,099	0	13	95	13,7%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	-
10	p13	4666	RP11-40D12	-	13,618,087	13,798,901	10	2	95	12,6%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	-----	+
10	p12.31	2856	RP11-51E20	AQ053629.1	20,739,152	20,949,210	3	63	270	24,4%	Redon et al. (2006)	-	sehr gut	-----	-
10	p11.23	4674	RP11-350D11	AQ538081.1	30,675,157	30,865,135	0	11	95	11,6%	Wong et al. (2007)	+	sehr gut	15q24	-
10	p11.21	4676	RP11-810B23	AQ622261.1	36,343,125	36,519,689	11	0	95	11,6%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	-----	+
10	p11.1	4678	RP11-43M19	AQ195501.1	38,998,787	39,116,217	1	14	95	15,8%	Wong et al. (2007)	+	sehr gut	2cen, 14cen, 16cen, 22cen, Ycen	-
10	p11.1	4679	RP11-43M19	AQ195501.1	38,998,787	39,116,217	3	0	95	3,2%	Wong et al. (2007)	+	-	-	-
10	q11.22	4684	RP11-314P12	AL390716.27	46,487,307	46,562,342	11	0	95	11,6%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	-----	+
10	q11.22	2155	RP11-164N7	AQ380089.1	48,865,543	49,010,893	2	3	269	1,9%	Locke et al. (2006)	+	sehr gut	-----	-
10	q21.1	4695	RP11-123L21	AQ018508.9	57,811,029	57,960,929	0	14	95	14,7%	Wong et al. (2007)	+	gut	-----	-
10	q22.3	2157	RP11-259A6	AQ485496.1	80,084,778	80,241,593	0	16	269	5,9%	Locke et al. (2006)	-	gut	-----	-/+
10	q22.3	0765	RP11-136P13	AQ346822.1	81,422,755	81,589,260	5	0	47	10,6%	Sharp et al. (2005)	+	sehr gut	10q11.2	-
10	q22.3	2159	RP11-136P13	AQ346822.1	81,422,755	81,589,260	0	14	269	5,2%	Locke et al. (2006)	+	-	-	-
10	q22.3	0138	RP11-19C18	B82956.1	78,621,100	78,713,021	0	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	-	sehr gut	5p14.1, 5q13, 5q21	+
10	q23.1	2160	RP11-137H2	AQ382286.1	82317	82318	0	10	269	3,7%	Locke et al. (2006)	-	sehr gut	mehrere Chromosomen	-
10	q23.1	0762	RP11-80J7	AQ281216.1	82,383,415	82,539,916	0	1	47	2,1%	Sharp et al. (2005)	-	gut	-----	-
10	q23.1	2161	RP11-80J7	AQ281216.1	82,383,415	82,539,916	18	2	269	7,4%	Locke et al. (2006)	-	-	-	-
10	q23.2	2885	RP11-157H10	AQ374977.1	88,886,420	89,274,999	1	4	270	1,9%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	10q11	-
10	q24.2	4710	RP11-134P2	AQ379078.1	100,246,424	100,373,804	0	17	95	17,9%	Wong et al. (2007)	-	-	-----	+
10	q25.1	3820	RP11-56I23	AQ082950.1	107,519,652	107,743,529	-	31	270	11,5%	Redon et al. (2006)	-	gut	10q26	-
10	q25.2	4712	RP11-330J9	-	113,420,497	113,641,436	2	12	95	14,7%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	+
10	q26	2162	RP11-108K14	AQ323965	135,117,752	135,279,389	6	0	269	2,2%	Locke et al. (2006)	+	sehr gut	-----	-
10	q26.3	4716	RP11-8K5	-	131,500,713	131,698,871	8	13	95	22,1%	Wong et al. (2007)	-	gut	10q23	-
10	q26.3	4717	RP11-140A10	AQ386105.1	133,776,459	133,922,089	0	24	95	25,3%	Wong et al. (2007)	-	-	-----	-
10	q26.3	4721	RP11-466F21	AQ636561.1	134,791,894	135,070,617	0	13	95	13,7%	Wong et al. (2007)	-	-	-----	-
11	p14.3 -15.1	2166	RP11- 26I118	AQ483542.1	21,513,425	21,681,734	0	3	269	1,1%	Locke et al. (2006)	-	gut	-----	-
11	q11	2926	RP11-380O22	AQ535337.1	55,096,278	55,394,688	19	83	270	37,8%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	-----	-
11	q13.2	2169	RP11- 280I11	AQ508928.1	67,272,764	67,434,857	0	3	269	1,1%	Locke et al. (2006)	+	gut	4p16, 7p22, 11p15	-
11	p15	0767	RP11- 115I1C19	AQ749189.1	4,143,559	4,293,066	2	1	47	6,4%	Sharp et al. (2005)	+	sehr gut	-----	+
11	p15	2163	RP11- 115I1C19	AQ749189.1	4,143,559	4,293,066	4	9	269	4,8%	Locke et al. (2006)	+	-	-	-
11	p13.4	3833	RP11-11A9	B71834.1	3,193,088	3,758,005	-	89	270	33,0%	Redon et al. (2006)	+	11p15.5	-----	-
11	q24.2	5037	RP11-11J14	AC129528.1	124,705,792	124,839,738	0	11	95	11,6%	Wong et al. (2007)	-	5q31	-----	-
11	q14.1	0777	RP11-156K16	AC025076.3	79,241,083	79,426,794	1	0	47	2,1%	Sharp et al. (2005)	-	11q13	-----	-
11	q14.1	2184	RP11-156K16	AC025076.3	79,241,083	79,426,794	0	68	269	25,3%	Locke et al. (2006)	-	-	-	-
11	p15	0143	RP11-169C2	AQ015700.8	10078	10257	1	1	55	3,6%	lafrate et al. (2004)	-	sehr gut	-----	-
11	q14.1	0152	RP11-19P3	B88382.1	84,347,356	84,517,431	0	2	55	3,6%	lafrate et al. (2004)	-	sehr gut	-----	-/+
11	p11.12	2924	RP11-208A14	AQ418067.1	49,538,501	49,820,388	0	27	270	10,0%	Redon et al. (2006)	+	schwach	11q14	-
11	q22.1	4760	RP11-240L24	AQ484520.1	97,364,166	97,534,210	1	32	95	34,7%	Wong et al. (2007)	-	-	-----	-
11	p13	4733	RP11-297A4	AQ503485.1	31,195,990	31,386,312	14	0	95	14,7%	Wong et al. (2007)	+	gut	-----	-
11	q12.1	4746	RP11-299I24	-	59,152,983	59,187,691	0	12	95	12,6%	Wong et al. (2007)	-	-	-	-
11	q12.2	3854	RP11-339I12	AQ540171.1	60,671,936	60,837,233	-	182	270	67,4%	Redon et al. (2006)	+	gut	-----	-
11	q22.2	0155	RP11-33F6	AQ044970.1	102,438,737	102,497,333	0	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	-	gut	-----	+
11	q23.3	0159	RP11-356E17	AQ535047.1	115,830,842	116,041,424	0	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	-	gut	-----	+
11	p15.5	3831	RP11-401C19	AQ053984.7	399,846	1,313,968	-	166	270	61,5%	Redon et al. (2006)	-	sehr gut	-----	-
11	q14.1	4727	RP11-474J21	AQ634742.1	78,034,083	78,185,384	1	15	95	16,8%	Wong et al. (2007)	+	11p15.5	1q42	-
11	p15.4	4730	RP11-494F4	-	2,846,346	2,941,793	0	15	95	15,8%	Wong et al. (2007)	-	-	-	-
11	q12.3	0150	RP11-49D19	AQ052920.1	62,270,860	62,448,065	0	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	-	sehr gut	-----	-
11	q14.3	3861	RP11-546N8	AC026201.3	88,083,993	88,339,832	-	36	270	13,3%	Redon et al. (2006)	+	gut	11p11, 11p12	-
11	p11.2	5013	RP11-57A24	AQ083275.1	48,436,073	48,645,904	0	48	95	50,5%	Wong et al. (2007)	+	17q11	17q22	-
11	p15.5	4726	RP11-596I23	-	799,019	928,308	0	13	95	13,7%	Wong				

## Fortsetzung Tab. 40

12	p13.33	4765	RP11-636B1	AQ439289.1	1.580.511	1.738.903	11	0	95	11,6%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	-----	+
12	p13.33	0161	RP11-543P15	AC005912.1	3.099.613	3.265.128	0	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	-	gut	-----	-
12	p13.32	3875	RP11-407P10	AC078950.19	10.860.887	11.606.188	-	37	270	13,7%	Redon et al. (2006)	+	gut	-----	-
12	p13.31	4768	RP11-536M6	-	8.973.046	9.137.487	0	79	95	83,2%	Wong et al. (2007)	-	schwach	-----	-
12	p13.31	2968	RP11-277E18	AC007536.10	7.791.451	8.033.850	11	0	270	4,1%	Redon et al. (2006)	+	gut	2, 21	+
12	p13.31	2970	RP11-726G1	AC006432.15	9.474.722	9.702.031	132	61	270	71,5%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	12p11	-
12	p12.3	4771	RP11-692M23	AQ459864.1	18.876.345	19.048.244	0	11	95	11,6%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	-----	+
12	p12.3	4770	RP11-807H9	AQ556118	17.109.169	17.286.588	10	0	95	10,5%	Wong et al. (2007)	-	schwach	13cen, 14cen, 15cen	+
12	p12.1	0163	RP11-12D15	B75735.1	22.210.387	22.369.559	1	1	55	3,6%	lafrate et al. (2004)	-	sehr gut	11q21	-
12	p11.21	2976	RP11-562P10	AC008010.11	31.125.435	31.335.485	12	2	270	5,2%	Redon et al. (2006)	+	gut	12p13	-
12	cent	4775	RP11-657P13	AC119042.9	36.291.737	36.404.136	0	16	95	16,8%	Wong et al. (2007)	-	schwach	acrocen, 19cen, 20cen	+
12	q13.3	3891	RP11-181L23	AC022506.38	56.116.000	56.288.135	-	37	270	13,7%	Redon et al. (2006)	-	sehr gut	15cen	-
12	q21.1	4781	RP11-349G3	AQ530777.1	71.064.326	71.253.094	1	12	95	13,7%	Wong et al. (2007)	+	sehr gut	5p15.3	-
12	q21.31	4782	RP11-136P3	AQ346819.1	81.081.422	81.257.828	0	13	95	13,7%	Wong et al. (2007)	-	gut	1q42, 12q13	-
12	q12.32	0165	RP11-900F13	AC024941.30	87.352.898	87.525.143	1	1	55	3,6%	lafrate et al. (2004)	-	schwach	-----	+
12	q24.13	0166	RP11-900D13	AC0283611.1	110.966.985	111.143.652	2	2	55	7,3%	lafrate et al. (2004)	-	gut	2p14	-
12	q24.31	4792	RP11-107L10	AQ316341.1	123.391.293	123.572.267	0	14	95	14,7%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	-
12	q24.33	0769	RP11-146E8	AQ372299.1	130.269.522	130.437.504	1	0	47	2,1%	Sharp et al. (2005)	+	sehr gut	-----	-
12	q24.33	4404	RP11-503G7	A2933535.1	131.615.887	131.801.741	0	20	95	21,1%	Wong et al. (2007)	-	-	-	-
13	q14.11	4799	RP11-706L14	AQ466322.1	40.502.931	40.696.808	48	0	95	50,5%	Wong et al. (2007)	-	schwach	-----	-
13	q14.3	4804	RP11-483O1	AQ637235.1	51.074.984	51.260.526	14	0	95	14,7%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	-
13	q21.1	0169	RP11-100C24	AQ322007.1	56.600.597	56.729.949	3	16	55	34,5%	lafrate et al. (2004)	-	sehr gut	-----	+
13	q21.31	2173	RP11-151G10	AQ377638.1	62.681.765	62.844.117	0	2	269	0,7%	Locke et al. (2006)	-	sehr gut	-----	-
13	q21.31	4807	RP11-809O8	AC068977.3	62.267.119	62.426.941	10	0	95	10,5%	Wong et al. (2007)	+	sehr gut	2p, 11q, 14q, 16q, 17p, 21q	+
13	q21.32	4808	RP11-1L24	AQ315978.1	64.741.929	64.903.073	21	0	95	22,1%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	-
13	q21.33	4810	RP11-590P16	-	70.276.042	70.440.953	0	13	95	13,7%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	20q12	+
13	q31.1	4813	RP11-164M23	AQ378270.1	83.926.184	84.091.797	24	0	95	25,3%	Wong et al. (2007)	-	gut	WCP9	-
13	q31.31	0171	RP11-80N10	AQ284186.1	80.203.304	80.367.022	0	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	-	sehr gut	-----	+
14	q11.1	0812	RP11-645B7	AQ404284.1	18.654.379	18.833.779	1	2	47	6,4%	Sharp et al. (2005)	+	sehr gut	-----	-
14	q24.33	2256	RP11-645B7	AQ404284.1	18.654.379	18.833.779	39	1	269	14,9%	Locke et al. (2006)	+	sehr gut	-----	-
14	q11.1	0376	RP11-831B15/RP11-24N17	AQ818166.1	19.273.689	19.767.232	0	28	50	56,0%	Bejjani et al. (2005)	+	sehr gut	-----	-
14	q11.2	4826	RP11-449I24	AQ583380.1	19.289.489	19.485.285	49	0	95	51,6%	Wong et al. (2007)	+	gut	15cen	-
14	q11.2	4831	RP11-262M15	AQ488801.1	21.867.481	22.006.855	39	0	95	41,1%	Wong et al. (2007)	-	sehr schwach	-----	-
14	q11.2	4829	RP11-642H22	-	21.628.027	21.807.284	18	0	95	18,9%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	+
14	q12	0175	RP11-125A5	AQ345961.1	28.581.578	28.768.137	6	2	55	14,5%	lafrate et al. (2004)	-	gut	-----	-
14	q13.2	0176	RP11-26M6	B84609.1	34.404.823	34.591.592	0	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	-	gut	-----	-
14	q22.1	4836	RP11-589E15	-	53.156.747	53.212.308	0	16	95	16,8%	Wong et al. (2007)	-	-	5cen, 19cen	-
14	q24.1	4838	RP11-350H11	AQ531281.1	67.944.394	68.130.025	0	24	95	25,3%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	-----	+
14	q24.3	3942	RP3-414A15	AQ274697.1	73.030.050	73.196.823	-	52	270	19,3%	Redon et al. (2006)	-	gut	13	+
14	q32	0773	RP11-141I7	AQ384780.1	105.679.974	105.831.033	0	32	47	68,1%	Sharp et al. (2005)	+	sehr gut	-----	-
14	q32	2178	RP11-141I7	AQ384780.1	105.679.974	105.831.033	23	12	269	13,0%	Locke et al. (2006)	+	sehr gut	-----	-
14	q32.11	4844	RP11-1A3	AQ311578.1	89.355.040	89.526.429	24	0	95	25,3%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	-----	+
14	q32.33	3950	RP11-817G24	AQ559734.1	104.584.391	105.020.471	1	1	270	0,4%	Redon et al. (2006)	-	sehr gut	3q24, 5q32, 11qter	-
14	q32.33	0774	RP11-76N15	AQ281640.1	106.099.160	106.230.477	1	5	47	12,8%	Sharp et al. (2005)	-	sehr gut	16cen	-
14	q32.33	2179	RP11-76N15	AQ281640.1	106.099.160	106.230.477	1	41	269	15,6%	Locke et al. (2006)	-	sehr gut	-----	-
14	q32.33	4858	RP11-379F22	AQ533436.1	105.991.295	106.085.250	0	27	95	28,4%	Wong et al. (2007)	+	sehr gut	16p11	-
15	q11.1	3070	RP11-2F9	B63286.1	18.403.665	21.241.985	204	24	270	84,4%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	14q11.2	-
15	q11.2	4874	RP11-603B24	AC025884.28	19.932.331	20.097.557	23	6	95	30,5%	Wong et al. (2007)	+	sehr gut	1pterlater, 5q32, 13/14/21cen, 14qter	-
15	q11.2	4881	RP11-110H15	AQ350730.1	22.203.544	22.386.839	12	0	95	12,6%	Wong et al. (2007)	+	sehr gut	6q15, 7p15, 10q25, 11cen	-
15	q12	0775	RP11-138C5	AQ382830.1	19.203.509	19.367.828	0	18	47	38,3%	Sharp et al. (2005)	+	sehr gut	-----	+
15	q12	2180	RP11-138C5	AQ382830.1	19.203.509	19.367.828	102	0	269	37,9%	Locke et al. (2006)	+	-	-	-
15	q12	4870	RP11-138C5	AQ382830.1	19.203.509	19.367.828	19	3	95	23,2%	Wong et al. (2007)	+	-	-	-
15	q13	3075	RP11-624A21	AQ371208.1	29.762.552	30.740.356	3	0	270	1,1%	Redon et al. (2006)	+	gut	-----	-
15	q13.1	-	RP11-477L23	AQ636423.1	26957	26958	-	-	-	-	-	-	-	15q12, 15q24	+
15	q13.2	3955	RP11-261B23	AQ483653.1	28.080.236	28.939.783	-	66	270	24,4%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	-----	+
15	q13.2	4887	RP11-738I24	AC091057.6	28.694.446	28.838.991	56	0	95	58,9%	Wong et al. (2007)	+	sehr gut	-----	+
15	q13.3	0782	RP11-30N16	B87904.1	30.213.188	30.412.040	0	2	47	4,3%	Sharp et al. (2005)	+	gut	-----	-
15	q13.3	2190	RP11-30N16	B87904.1	30.213.188	30.412.040	0	20	269	7,4%	Locke et al. (2006)	+	-	-----	-
15	q13.3	4892	RP11-282F10	-	30.316.092	30.502.594	2	10	95	12,6%	Wong et al. (2007)	+	gut	8q22	-
15	q14	0784	RP11-1H8	B63169.1	32.518.465	32.669.922	16	0	47	34,0%	Sharp et al. (2005)	+	sehr gut	15q25, 15q26	-
15	q14	2193	RP11-1H8	B63169.1	32.518.465	32.669.922	0	5	269	1,9%	Locke et al. (2006)	+	-	-----	-
15	q14	4897	RP11-475A13	AQ635306.1	34.377.740	34.564.894	24	0	95	25,3%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	-----	+
15	q14.1	0187	RP11-194H7	AQ412869.1	32.397.743	32.458.774	0	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	+	gut	6q22, 15qter	-
15	q14.1	0783	RP11-194H7	AQ412869.1	32.397.743	32.458.774	4	0	47	8,5%	Sharp et al. (2005)	+	-	-	-
15	q23	2194	RP11-47G3	AQ202180.1	69366	69367	0	16	269	5,9%	Locke et al. (2006)	+	gut	-----	-
15	q24.13	0189	RP11-500O23	AZ301221.2	70.606.840	70.796.533	0	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	+	sehr gut	-----	+
15	q24.3	4905	RP11-797A18	AQ722186.1	75.022.951	75.180.695	0	11	95	11,6%	Wong et al. (2007)	-	gut	7q22, 16q23, Xq22	+
15	q25	0190	RP11-910I13	AQ282541.1	80.913.914	81.082.896	0	1	55	1,8%	lafrate et al. (2004)	+	sehr gut	-----	-
15	q25.2	2199	RP11-246L14	AQ480297.1	82.722.674	82.870.925	0	3	269	1,1%	Locke et al. (2006)	+	sehr gut	-----	-
15	q25.2	3973	RP11-671M22	AQ409565.1	82.506.626	82.870.925	-	30	270	11,1%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	15q11	-
15	q26.2	0192	RP11-120N1	AQ341084.1	95.833.747	95.937.053	0	2	55	3,6%	lafrate et al. (2004)	-	gut	-----	+
15	q26.3	2201	RP11-67J16	AQ198995.1	99.117.325	99.291.851	0	3	269	1,1%	Locke et al. (2006)	-	schwach	-----	-





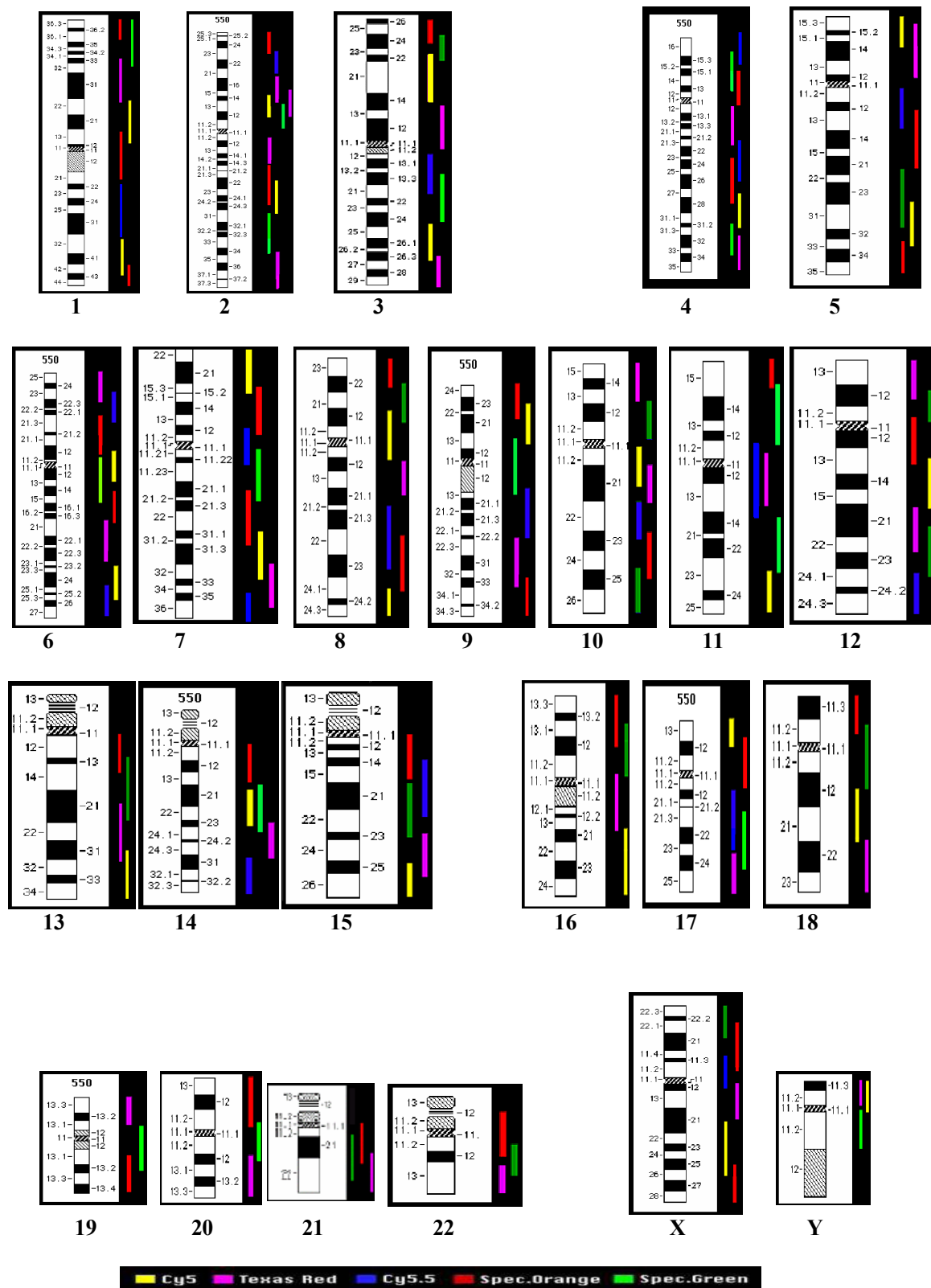
20	p13	4090	RP11-77C3	AQ268055	1,424,781	1,627,256	-	78	270	28.9%	Redon et al. (2006)	+	sehr gut	-----	-
20	p12.3	5124	RP11-164M15	AQ378258.1	7,288,381	7,476,529	0	24	95	25.3%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	-----	-
20	p12.1	0224	RP11-80N12	AQ317837	16,723,471	16,896,316	0	1	55	1.8%	lafarte et al. (2004)	-	sehr gut	-----	+
20	p12.1	5127	RP11-9L7	-	16,082,347	16,250,763	22	0	95	23.2%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	-
20	p11.21	5128	RP11-288G22	-	22,605,016	22,651,454	13	0	95	13.7%	Wong et al. (2007)	-	schwach	1cen, 4cen, 9cen, acrocen	-
20	q11.21	4100	RP11-322B6	AQ537190	30,959,468	31,211,827	-	47	270	17.4%	Redon et al. (2006)	-	schwach	1, 12, 16	-
20	q11.21	5131	RP11-559K10	-	29,297,109	29,341,866	1	10	95	11.6%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	-
20	q11.23	5136	RP11-727D18	AQ455894.1	35,879,175	35,971,325	10	0	95	10.5%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	-----	+
20	q13.12	4102	RP11-81110	AQ51572	44,126,322	44,398,283	-	118	270	43.7%	Redon et al. (2006)	-	gut	-----	-
20	q13.2	0286	RP4-749H19	AL031674	54896	55076	1	0	55	1.8%	lafarte et al. (2004)	-	sehr gut	13q33	-
20	q13.32	4104	RP11-402F1	AL162291	55,604,184	56,121,677	-	36	270	13.3%	Redon et al. (2006)	-	sehr gut	15q14	-
20	q13.33	5144	RP11-93B14	AQ312034	60,738,089	60,897,084	0	7	95	7.4%	Wong et al. (2007)	-	sehr gut	8cen, 9pter	-
20	q13.33	5150	RP11-95N13	AQ315671	61,564,623	61,727,698	0	13	95	13.7%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	-
20	q13.33	5146	RP11-543D7	-	61,178,258	61,326,392	0	29	95	30.5%	Wong et al. (2007)	-	schwach	19cen	-
21	p11.2	2253	RP11-139G21	AQ382339	10,023,843	10,187,384	0	2	269	0.7%	Locke et al. (2006)	+	sehr gut	Chr. Gruppe D.G	-
21	p11.2	5151	RP11-376P20	-	9,721,646	9,791,026	1	33	95	35.8%	Wong et al. (2007)	-	gut	acrocen, 20cen	-
21	p11.2	5153	RP11-430M17	AQ552540	9,769,017	9,959,722	0	29	95	30.5%	Wong et al. (2007)	+	gut	acrocen, 20cen, Ycen	+
21	p11.2	5155	RP11-313K4	-	9,914,909	9,960,850	0	21	95	22.1%	Wong et al. (2007)	+	sehr gut	7cen, 9cen, 10cen, acrocen	+
21	q11.2	0811	RP11-1126H14	AQ698240	13,831,889	13,995,202	0	7	47	14.9%	Sharp et al. (2005)	+	schwach	acrocen	-
21	q11.2	2255	RP11-1126H14	AQ698240	13,831,889	13,995,202	3	0	269	1.1%	Locke et al. (2006)	+	-	-----	-
21	q11.2	5157	RP11-25L22	AQ003153	13,879,420	14,043,771	7	1	95	8.4%	Wong et al. (2007)	+	schwach	2q21, acrocen, 18p11	+
21	q11.2	5158	RP11-641G16	AQ431923	14,822,550	15,034,721	0	11	95	11.6%	Wong et al. (2007)	-	gut	-----	-
21	q21.1	0231	RP11-49J9	AQ053102	20,982,316	21,153,633	1	0	55	1.8%	lafarte et al. (2004)	-	gut	-----	-
21	q21.1	3229	RP11-66K22	AF000657.3	22,483,789	22,596,775	0	62	270	23.0%	Redon et al. (2006)	-	schwach	12p11, 12qter	+
21	q21.1	5160	RP11-580L2	-	20,801,914	20,976,458	52	5	95	60.0%	Wong et al. (2007)	-	schwach	2q22, 2pter, 4p15, 9p21	-
21	q22.11	5161	RP11-531P14	-	32,080,140	32,268,308	12	0	95	12.6%	Wong et al. (2007)	-	sehr schwach	-----	-
21	q22.3	0293	RP11-88N2	AQ											

Tab. 41: Primer für die Mikrosatelliten-PCR.

Nr.	Primer	Lokalisation	Größe [bp]	Nr. in Abb. 25
8.1	D8S1099	8p23	253	-
8.2	D8S1145	8p21	271	-
8.3	D8S1110	8q11	262-286	7
8.4	D8S1113	8q12	215-245	8
8.5	D8S1119	8q21	173-197	9
8.6	D8S1132	8q23	150	10
8.7	D8S1128	8q24	240-268	11
8.8	D8S0373	8q24	197-213	12
8.a	D8S264	8p23	121-145	1
8.b	D8S1130	8p22	132-156	2
8.c	D8S1106	8p22	135-160	3
8.d	D8S1145	8p22	259-299	4
8.e	D8S136	8p21	70-90	5
8.f	D8S1477	8p12	139-179	6

Tab. 42: Primer für die RealTime-PCR.

Primer	Sequenz
P 1 Forward	caaatgggaaaaggcatgat
P 1 Revers	actgacctcaccagaccag
P 4 Forward	ctctgacctttgccgtga
P 4 Revers	ccagcatggacaatagagca
P 9 Forward	acctgagatctgcctcaaa
P 9 Revers	cacctctatgggtgcctggt
P 13 Forward	ttgattcatggggatggatt
P 13 Revers	tggaacaggaaagatgagg
P 17 Forward	tctctgctccaagagcaat
P 17 Revers	tggcaccactcactggacta
P 21 Forward	cagcatatttccagggtggt
P 21 Revers	ggcagaacccagtcaaaaga
P 25 Forward	atttcaggccagcctttct
P 25 Revers	catcgaagccatgaggaaat
P 29 Forward	ggagcctgtttccaacagaa
P 29 Revers	tggggagaggattgtcaaag
P 33 Forward	ggatcaaagccaaatgagga
P 33 Revers	ggtgttgctgccatctctt
P 38 Forward	gagcccagagattcaggatg
P 38 Revers	ctcttccactgggtttcca
P 41 Forward	ccttccaacaaatccaaga
P 41 Revers	ggagtgagatgagcctctgg
P 1-2 ACTB Forward	caccttcaccgttccagttt
P 1-2 ACTB Revers	gatgagattggcatggcttt
P 2-2 ACTB Forward	ggggtgtgaaggtctcaaa
P 2-2 ACTB Revers	ttgcactttctgcatgtcc
P 3-2 ACTB Forward	cagttagcgcccaaaggac
P 3-2 ACTB Revers	tcttgccaatggggatcg
P 1-1 ACTB Forward	tcttgccaatggggatcg
P 1-1 ACTB Revers	cagttagcgcccaaaggac
P 2-1 ACTB Forward	aagatgaccaggtgagtgg
P 2-1 ACTB Revers	aacggcagaagagagaacca
P 3-1 ACTB Forward	gatgatattggcaatggcttt
P 3-1 ACTB Revers	caccttcaccgttccagttt



**Abb. 28: Markierungsschema der DNA-Sonden für mMCB.** Dargestellt ist die Größe, Lage und Markierung der jeweiligen DNA-Sonden.

**Tab. 43: Zusammenfassung der verwendeten BACs im Subtelomerbereich.** Von links nach rechts beschrieben sind die zytogenetische Lage der BAC-Klone, deren Name und Datenbanknummer, die Signalstärke und der Abstand vom Telomer des kurzen Arms in kb.

Chromosom	Lokalisation	BAC	AC	Signalstärke	Start kb	Ende kb
5	q35.3	RP11-240G13	-	+	180.512	180.626
9	p34.3	RP11-393D13	BH141105.1	+	236	427
9	p34.3	RP11-1021N5	AQ593522.1	+	150	333
9	p34.3	2241C11 (Cosmid)	-	+	-	-
11	p15.5	RP11-1021K7	AQ697676.1	+	668	668
11	p15.5	RP11-51L17	AQ052363.1	+	764	942
11	p15.5	RP11-496F2	AZ695077	+	668	872
11	p15.5	2209A2 (Cosmid)	-	+	-	-
11	q25	RP11-186N3	AQ422456.1	+	134.184	134.356
11	q25	RP11-1077G24	AQ744064.1	++	133.998	134.194
11	q25	RP11-265F9	AQ484019.1	++	134.272	134.411
11	q25	RP11-267D5	AQ487857.1	++	133.964	134.130
12	p13.3	RP11-519B13	AZ916624.1	+	28	214
12	p13.3	RP11-12H17	B75812.1	+	345	484
12	p13.3	RP11-367L11	AQ529919.1	+	366	537
13	q34	RP11-63L17	AQ200393.1	+	113.782	113.954
13	q34	RP11-960N24	AQ739689.1	++	113.904	114.103
13	q34	RP11-450H16	AZ773446.1	++	113.958	114.117

**Tab. 44: Bestimmung des Cut Offs der BACs der Subtelomerbereiche.**

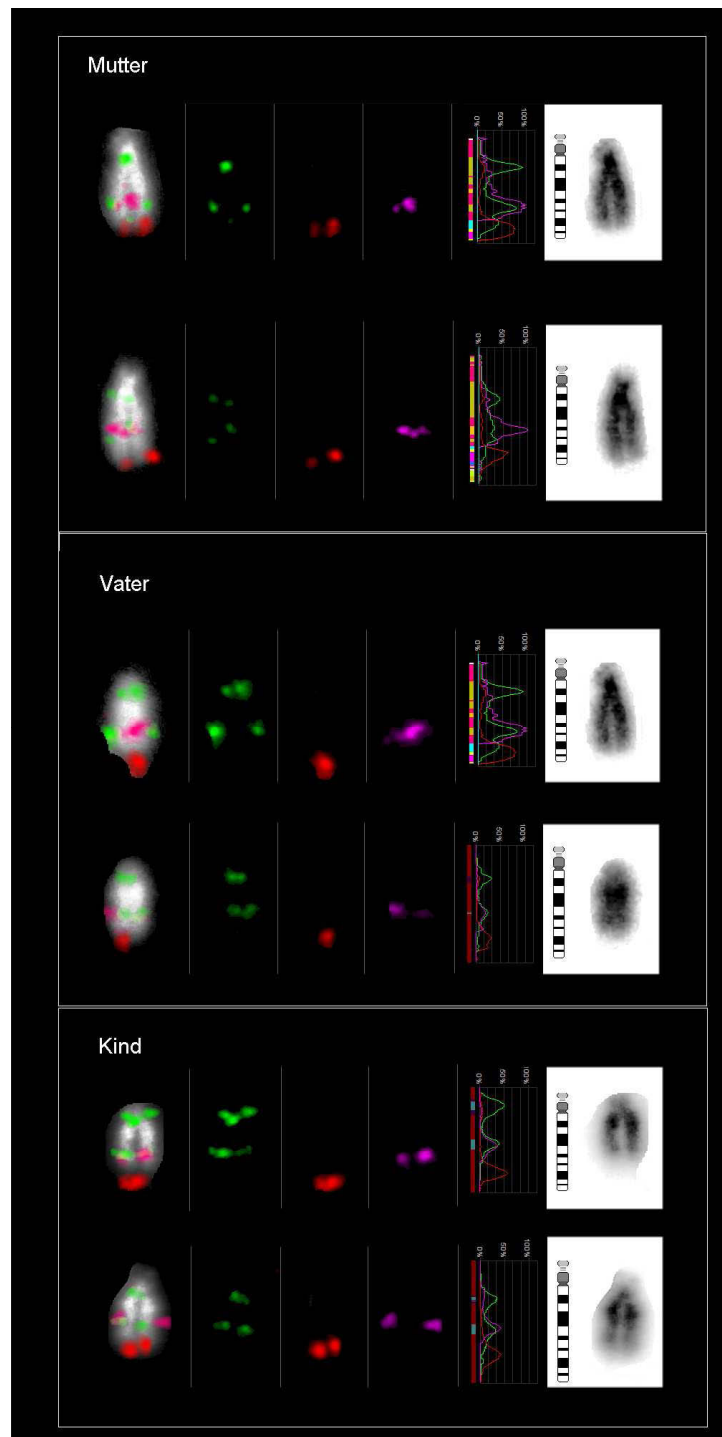
Fall	St 5q		St 9p		St 11p		St 11q		St 12p		St 13q	
	del	+ / ++	del	+ / ++	del	+ / ++	del	+ / ++	del	+ / ++	del	+ / ++
Kontrolle	5,23	2,61/0,65	3,85	0,96/1,92	2,56	0,64/0,64	3,33	1,33/0,67	3,25	1,3/0,65	3,85	1,92/1,92

**Tab. 46: Ergebnisse der Hybridisierung der DNA-Sonden des mMCB auf AML-Fälle mit Trisomie 8.**

Fall	ED	Geschlecht	Alter bei ED	Karyotyp	mMCB	Ergebnis mMCB
1	AML-M1	weiblich	57	47,XX,+8 [7] / 46,XX [13]	-	-
2	AML aus MDS	weiblich	72	47,XX,+8 [3] / 46,XX [2]	-	-
3	AML aus MDS	weiblich	53	47,XX,+8 / 46,XX	-	-
4	AML aus MDS	männlich	56	kein Erstbefund	-	-
5	AML aus MDS	männlich	30	47,XX,+8 / 46,XX	-	-
6	AML aus MDS	männlich	69	47,XY,+8 [15] / 46,XY [6]	-	-
7	AML aus MDS	männlich	70	47,XY,+8 [2] / 46,XY [12]	-	-
8	AML	männlich	77	47,XY,+8	+	unauffällig
9	AML	weiblich	40	47,XX,+8 / 46,XX	+	unauffällig
10	AML-M2	weiblich	74	47,XX,+8	+	unauffällig
11	AML aus MDS	männlich	70	47,XY,+8	+	zu wenige MPP
12	AML	weiblich	12	47,XX,+8 / 46,XX	+	unauffällig
13	AML aus MDS	weiblich	62	47,XX,+8 / 46,XX	+	zu wenige MPP

**Tab. 47: Ergebnisse der Hybridisierung der BACs der Subtelomerbereiche auf AML-Fälle mit Trisomie 8.**

Fall	ED	Geschlecht	Alter bei ED	Karyotyp	St 9q (2241C1)	St 11p (2209A2)	St 12p (RP11-9015)
1	AML-M1	weiblich	57	47,XX,+8 [7] / 46,XX [13]	-	-	-
2	AML aus MDS	weiblich	72	47,XX,+8 [3] / 46,XX [2]	-	-	-
3	AML aus MDS	weiblich	53	47,XX,+8 / 46,XX	-	-	-
4	AML aus MDS	männlich	56	kein Erstbefund	-	-	-
5	AML aus MDS	männlich	30	47,XX,+8 / 46,XX	-	-	-
6	AML aus MDS	männlich	69	47,XY,+8 [15] / 46,XY [6]	-	-	-
7	AML aus MDS	männlich	70	47,XY,+8 [2] / 46,XY [12]	-	-	-
8	AML	männlich	77	47,XY,+8	unauffällig	unauffällig	unauffällig
9	AML	weiblich	40	47,XX,+8 / 46,XX	unauffällig	unauffällig	unauffällig
10	AML-M2	weiblich	74	47,XX,+8	unauffällig	unauffällig	unauffällig
11	AML aus MDS	männlich	70	47,XY,+8	zu wenige MPP	zu wenige MPP	zu wenige MPP
12	AML	weiblich	12	47,XX,+8 / 46,XX	unauffällig	unauffällig	unauffällig
13	AML aus MDS	weiblich	62	47,XX,+8 / 46,XX	zu wenige MPP	zu wenige MPP	zu wenige MPP



**Abb. 29: Hybridisierungsergebnisse der BACs des Chromosoms 14 auf Metaphasechromosomen von Vater, Mutter und Kind. Die Signalkonstellationen der BACs waren auf den Chromosomen der drei Familienmitglieder gleich.**



**Tab. 48: Auflistung der Fälle mit Chromosomenaberrationen.** Neben der Fallnummer, der Familienmitglieder sowie der Karyotyp und Nachweis ist angegeben, welche DNA-Sonden für pod-FISH eingesetzt wurden sowie deren Ergebnis.

Fall	Familien - mitglieder	Karyotyp	Nachweis durch...	pod - FISH	Ergebniss
1	Vater	46,XY	Zytogenetik	Einzelhybridisierung von RP11-449I24; RP11-831B15	RP11-449I24 SU
	Mutter	45,XX,t(14;21)	Molekulare Zytogenetik MCB14	Einzelhybridisierung von RP11-449I24; RP11-831B15	RP11-449I24 kein SU
	Tochter	45,XX,t(14;21) r(22)	Molekulare Zytogenetik MCB14	POD14_Mix1/2/3 Einzelhybridisierung von RP11-449I24; RP11-831B15; RP-125A5, RP3-414A15	SU bei RP11-831B15 und RP11-449I24 SU nach Einzelhybridisierung
2	Vater	46,XY,inv(9)(p11q13)	Zytogenetik		
	Mutter	46,XX	Zytogenetik		
	Tochter	46,XX,inv(9)(p11q13)	Zytogenetik	POD9_Mix1	nicht auswertbar
3	Vater	46,XY,inv(9)(p11q13)	Zytogenetik	POD9_Mix1	nicht auswertbar
	Mutter	46,XX	Zytogenetik		
	Tochter	46,XX	Zytogenetik	POD9_Mix1	
4	Vater	46,XY	Zytogenetik		
	Mutter	46,XX	Zytogenetik		
	Tochter	46,XX,+13,der(13,14)	Zytogenetik	POD13_Mix1/2/3 Einzelhybridisierung von RP11-151G10	keine SU detektierbar
5	Vater	46,XY	Zytogenetik		
	Mutter	46,XX	Zytogenetik		
	Tochter	46,XX,del(22)(q13.32)	Molekulare Zytogenetik Deletion d. ARSA - Sonde und d. YAC 899G12; RP11-226C8 Bruchpunktüberspannend	POD22_Mix1 + YAC899G12 POD22_Mix2 + RP11-689F11 POD22_Mix3 + RP11-689F11	keine SU detektierbar
6	Vater	46,XY	Zytogenetik		
	Mutter	46,XX	Zytogenetik		
	Tochter	46,XX,del(5)(p13.3)	Zytogenetik	POD5_Mix 1/2	keine SU detektierbar
7	Vater	46,XY,t(6;13)(q15;q13)	Molekulare Zytogenetik MCB6, MCB13	Einzelhybridisierung von RP11-80L16	Qualität der Hybridisierung sehr schlecht
	Mutter	46,XX	Zytogenetik	Einzelhybridisierung von RP11-80L16	RP11-80L16 kein SU
	Sohn	46,XY,inv(6)(p24q21~22.1)	Molekulare Zytogenetik MCB6, PCP6p, Subtel6p	POD6_Mix1/2 Einzelhybridisierung von RP11-897A20; RP11-427G15; RP11-80L16; RP11- 214H13	SU bei RP11-80L16 nach Einzelhybridisierung
8	Vater	46,XY	Zytogenetik		
	Mutter	46,XX	Zytogenetik		
	Tochter	46,XX,min(7)(p11.2→q11.21) r(7)(p11.2→q11.21) r(7)(p11.2→q11.2::p11.2→q11.2)	Molekulare Zytogenetik MCB7	POD7_Fall8_Mix1/2	kein SU detektierbar
9	Vater	46,XY,inv(5)(q13q35.2)	Molekulare Zytogenetik MCB5, Subtel5q		
	Mutter	46,XX	Zytogenetik		
	Tochter	46,XX,inv(5)(q13q35.2), t(10;13)(q26.1;q31)	Molekulare Zytogenetik MCB5, MCB13, MCB10, Subtel5q	POD5_Mix 1/2, POD10_Mix1/2, POD13_Mix1/2	kein SU detektierbar
10	Vater	46,XY	Zytogenetik		
	Mutter	46,XX	Zytogenetik		
	Tochter	46,XX,dup(18)(q21.1q21.2)	Molekulare Zytogenetik MCB18, RP11-742D12, RP11-160B24	POD18_Mix1/2	kein SU detektierbar
11	Vater	46,XX	Zytogenetik		
	Mutter	46,XY	Zytogenetik		
	Tochter	46,XX,t(3;16)((p24.3~p25.1;q23)	Molekulare Zytogenetik MCB3, MCB16	POD3_Mix1, POD16_Mix1/2/3	kein SU detektierbar
12	Vater	46,XY	Zytogenetik		
	Mutter	46,XX	Zytogenetik		
	Fruchtwasser	46,XY,i(20q)	Zytogenetik	POD20_Mix1/2/3 + PCP20p	kein SU detektierbar

**Tab. 49: Zusammenstellung der chromosomenspezifischen Mixe.** Die farblichen Bereiche zeigen die jeweilige Markierung der BAC-Klone.

Chromosom	Bande	Variation	BAC	Zugewinn	Verlust	Anzahl Probanden	Häufigkeit [%]	Signalstärke	Mix
1	p36.33-32	4193	RP11-83K22	0	48	95	50,5%	sehr gut	MIX1
	p34.2	4219	RP11-350G5	3	37	95	42,1%	sehr gut	MIX1
	p34.1	4222	RP11-200M7	23	0	95	24,2%	sehr gut	MIX1
	p32.1	4226	RP11-45F22	10	0	95	10,5%	sehr gut	MIX1
	p21.1	3302	RP11-508C1	-	175	270	64,8%	sehr gut	MIX1
	p13.3	3305	RP11-483I13	-	113	270	41,9%	schwach	MIX1
	q24.2	3319	RP11-97P20	0	116	270	43,0%	gut	MIX1
	q31	0687	RP11-109P13	0	6	47	12,8%	gut	MIX1
	q42.2	4271	RP11-109G24	0	21	95	22,1%	sehr gut	MIX1
	p36.32	4197	RP11-631K6	1	11	95	12,6%	schwach	MIX2
	p34.1	4221	RP11-164M17	20	0	95	21,1%	schwach	MIX2
	p32.3	4223	RP11-469M21	0	28	95	29,5%	sehr gut	MIX2
	p31.1	4233	RP11-808D16	11	0	95	11,6%	sehr gut	MIX2
	p21.1	4238	RP11-107J8	7	5	95	12,6%	sehr gut	MIX2
	p13.1	4243	RP11-656J2	11	0	95	11,6%	sehr gut	MIX2
	q21.3	3314	RP1-110I3	0	138	270	51,1%	gut	MIX2
	q25.1	4262	RP11-354H16	5	11	95	16,8%	sehr gut	MIX2
	p36.31	4202	RP11-719E21	0	15	95	15,8%	schwach	MIX3
	p34.1	4220	RP11-802K22	0	25	95	26,3%	sehr gut	MIX3
	p32.2	0008	RP6-65F20	9	3	55	21,8%	gut	MIX3
	p22.2	3298	RP4-531M19	-	27	270	10,0%	schwach	MIX3
	p21.1	0012	RP11-259N12	10	7	55	30,9%	schwach	MIX3
	p13.1	3307	RP4-686J16	-	56	270	20,7%	gut	MIX3
	q23.3	2329	RP11-5K23	28	23	270	18,9%	gut	MIX3
	q25.3	4265	RP11-120O21	4	40	95	46,3%	sehr gut	MIX3
	q41	4270	RP11-264D3	9	1	95	10,5%	sehr gut	MIX3
2	p24.1	3346	RP11-77O22	-	190	270	70,4%	sehr gut	MIX1
	p13.1	3366	RP11-1P9	-	29	270	10,7%	sehr gut	MIX1
	p12	0265	RP11-398N13	0	2	20	10,0%	gut	MIX1
	p11.2	4295	RP11-15J7	0	25	95	26,3%	sehr gut	MIX1
	p11.2	0373	RP11-421K23	0	44	50	88,0%	gut	MIX1
	q14.2	4304	RP11-818M2	18	0	95	18,9%	sehr gut	MIX1
	q23.3	4311	RP11-58K7	24	0	95	25,3%	sehr gut	MIX1
	q23.3	4312	RP11-811N16	13	0	95	13,7%	sehr gut	MIX1
	q24.3	4318	RP11-1N14	17	0	95	17,9%	sehr gut	MIX1
	q36.3	4329	RP11-474O20	17	0	95	17,9%	sehr gut	MIX1
	q37.1	3408	RP11-52C8	-	138	270	51,1%	sehr gut	MIX1

Fortsetzung Tab. 49

	p22.3	0018	RP11-119B15	0	1	55	1,8%	gut	MIX2
	p22.2	3352	RP11-278G12	-	4	270	1,5%	sehr gut	MIX2
	p21.1	3354	RP11-130P22	-	1	270	0,4%	sehr gut	MIX2
	p15	0019	RP11-355B11	0	1	55	1,8%	gut	MIX2
	p11.2	0265	RP11-495B16	0	2	20	10,0%	schwach	MIX2
	q14.3	0269	RP11-31G7	0	1	20	5,0%	schwach	MIX2
	q21	0024	RP11-32C20	0	1	55	1,8%	sehr gut	MIX2
	q21.1	0025	RP11-89B17	0	2	55	3,6%	gut	MIX2
	q37	3411	RP11-341N2	-	2	270	0,7%	sehr gut	MIX2
	q31.1	0027	RP11-80D14	3	0	55	5,5%	gut	MIX2
	q35	0030	RP11-316O14	4	0	55	7,3%	gut	MIX2
3	p21.31	4333	RP11-219A11	7	9	95	16,8%	gut	MIX1
	p21.31	4335	RP11-787O14	0	18	95	18,9%	gut	MIX1
	p21.1	4339	RP11-813O11	11	0	95	11,6%	gut	MIX1
	cent	4346	RP13-650D1	12	0	95	12,6%	sehr gut	MIX1
	q26.32	0040	RP11-114M1	1	8	55	16,4%	gut	MIX1
	q28	3469	RP11-525C11	-	35	270	13,0%	gut	MIX1
	q29	2064	RP11-1112O10	27	12	269	14,5%	sehr gut	MIX1
4	p16.3	4372	RP11-70C24	0	18	95	18,9%	sehr gut	MIX1
	p16.1	3479	RP11-30E22	-	222	269	82,5%	sehr gut	MIX1
	p15.31	4380	RP11-644J20	9	18	95	28,4%	gut	MIX1
	q12-cent	4397	RP11-359C9	2	16	95	18,9%	sehr gut	MIX1
	q13.2	2524	RP11-597F18	7	45	270	19,3%	sehr gut	MIX1
	q34.3	4422	RP11-493B2	22	0	95	23,2%	sehr gut	MIX1
	p16.1	4377	RP11-612I3	6	11	95	17,9%	schwach	MIX2
	p16.1	2067	RP11-261G12	0	30	269	11,2%	schwach	MIX2
	p15.33	3482	RP11-771E3	-	133	269	49,4%	gut	MIX2
	cent	4762	RP11-36H19	16	0	95	16,8%	gut	MIX2
	q26	3510	RP11-320L7	-	95	270	35,2%	sehr gut	MIX2
	q35.1	4423	RP11-818I13	13	0	95	13,7%	sehr gut	MIX2
	p16.1	2067	RP11-261G12	0	30	269	11,2%	sehr gut	MIX3
	p15.2	4383	RP11-597E11	0	15	95	15,8%	gut	MIX3
	p13	4391	RP11-676K10	0	22	95	23,2%	sehr gut	MIX3
	q11	3494	RP11-365H22	-	65	270	24,1%	sehr gut	MIX3
	q31.21-22		RP11-412J20	-	48	270	17,8%	gut	MIX3
	q32.3	3526	RP11-240A2	-	264	270	97,8%	sehr gut	MIX3
	q35.2	3535	RP11-512O17	-	245	270	90,7%	sehr gut	MIX3
5	p15.33	0707	RP11-812N8	16	2	47	38,3%	sehr gut	MIX1
	p12	4441	RP11-813J10	15	0	95	15,8%	sehr gut	MIX1
	q15	3561	RP11-461G12	-	139	270	51,5%	gut	MIX1
	q23.1	4474	RP11-567A12	14	0	95	14,7%	sehr gut	MIX1
	q23.3	3576	RP11-1143N16	-	102	270	37,8%	gut	MIX1
	q32	3580	RP11-767D22	-	112	270	41,5%	gut	MIX1
	p15.1	4432	RP11-77P12	20	1	95	22,1%	sehr gut	MIX2
	q14.3	4459	RP11-813M23	11	0	95	11,6%	gut	MIX2
	q23.2	4477	RP11-44F1	13	0	95	13,7%	sehr gut	MIX2
	q34	3584	RP11-133G21	-	33	270	12,2%	schwach	MIX2
	q35.3	3589	RP11-265K23	-	54	270	20,0%	gut	MIX2

Fortsetzung Tab. 49

6	p22.1	4669	RP11-192H11	1	25	95	27,3%	gut	MIX1
	p21.33	3602	RP11-732M11	-	35	270	13,0%	gut	MIX1
	q14.1	3623	RP11-897A20	-	112	270	41,5%	gut	MIX1
	q16.3	3631	RP11-1145D19	-	130	270	48,2%	gut	MIX1
	q21	4506	RP11-638G1	27	1	95	29,5%	sehr gut	MIX1
	q25.3	4513	RP11-360G17	26	0	95	27,4%	sehr gut	MIX1
	q27	4518	RP11-294L23	1	10	95	11,6%	gut	MIX1
	p25.3	0374	RP11-328C17	15	0	50	30,0%	sehr gut	MIX2
	p21.33-32	4492	RP11-427G15	0	36	95	37,9%	sehr gut	MIX2
	q12	4002	RP11-80L16	0	213	270	78,9%	gut	MIX2
	q14.1	2644	RP11-483P24	0	65	270	24,1%	sehr gut	MIX2
	q15	3625	RP1-214H13	-	31	270	11,5%	sehr gut	MIX2
	q25.1	4512	RP11-655H19	20	0	95	21,1%	gut	MIX2
	q27	3655	RP11-37D8	-	72	270	26,7%	sehr gut	MIX2
7	p21.1	292	RP11-79G16	0	2	20	10,0%	gut	MIX1
	cent	4538	RP11-533E18	19	5	95	25,3%	sehr gut	MIX1
	q22	0724	RP11-188C21	0	11	47	23,4%	schwach	MIX1
	q31.33	4557	RP11-807H17	11	0	95	11,6%	gut	MIX1
	q34	0726	RP11-45N9	15	2	47	36,2%	gut	MIX1
	p15.3	4527	RP11-810J17	20	0	95	21,1%	sehr gut	MIX2
	q11.1	0375	RP11-144H20 (RP11-138B1)	0	11	50	22,0%	schwach	MIX2
	q22.1	3692	RP11-395B7	-	85	269	31,6%	gut	MIX2
	q32.2	4560	RP11-537A1	9	12	95	22,1%	sehr gut	MIX2
	q34	3707	RP11-1141E10	-	28	270	10,4%	sehr gut	MIX2
	q35	4572	RP11-634O11	0	67	95	70,5%	sehr gut	MIX2
	p15.1	4529	RP11-643O8	21	1	95	23,2%	sehr gut	MIX3
	q11.23	4543	RP11-422O1	0	16	95	16,8%	gut	MIX3
	q22.1	4550	RP11-344K24	0	11	95	11,6%	sehr gut	MIX3
	q33	3704	RP11-639H21	-	43	270	15,9%	sehr gut	MIX3
	q34	3708	RP11-307I2	-	206	270	76,3%	sehr gut	MIX3
8	p23	0736	RP11-774P7	6	15	47	44,7%	sehr gut	MIX1
	p23.1	4579	RP11-594D21	1	20	95	22,1%	sehr gut	MIX1
	p21.2	4588	RP11-115K10	11	0	95	11,6%	sehr gut	MIX1
	q11.21	4591	RP11-803P16	13	0	95	13,7%	sehr gut	MIX1
	q12.1	4594	RP11-430H18	16	6	95	23,2%	sehr gut	MIX1
	q21.2	0121	RP11-96G1	3	6	55	16,4%	sehr gut	MIX1
	p23.1	2736	RP11-351I21	65	63	270	47,4%	sehr gut	MIX2
	p23.3	4276	RP11-410N18	0	18	95	18,9%	schwach	MIX2
	p11.23	2749	RP11-122L4	0	92	270	34,1%	sehr gut	MIX2
	q12.1	3736	RP11-513O17	-	170	270	63,0%	sehr gut	MIX2
	q21.2	4601	RP11-317J10	43	0	95	45,3%	sehr gut	MIX2
	q24.22	3749	RP11-668K2	-	154	270	57,0%	gut	MIX2

Fortsetzung Tab. 49

9	p21.2	4616	RP11-802E2	17	4	95	22,1%	gut	MIX1
	p11.2	3769	RP11- 433F23	-	216	270	80,0%	sehr gut	MIX1
	q22.32	4645	RP11-519D15	18	0	95	18,9%	sehr gut	MIX1
	q32	0131	RP11-9H12	1	1	55	3,6%	sehr gut	MIX1
	q31.1	2826	RP11-386L12	3	70	270	27,0%	gut	MIX1
	q34.3	3787	RP11-424E7	-	27	270	10,0%	sehr gut	MIX1
	p24.3	0126	RP11-130C19	-	1	55	1,8%	gut	MIX2
	p22.2	0128	RP11-340N12	-	1	55	1,8%	schwach	MIX2
	p12	2818	RP11-708D13	15	21	270	13,3%	gut	MIX2
	q34.2	4659	RP11-205O8	1	10	95	11,6%	schwach	MIX2
	q34.3	3785	RP11-413M3	-	9	270	3,3%	sehr gut	MIX2
10	p13	4666	RP11-40D12	10	2	95	12,6%	sehr gut	MIX1
	p12.31	2856	RP11-51E20	3	63	270	24,4%	sehr gut	MIX1
	p11.21	4676	RP11-810B23	11	0	95	11,6%	sehr gut	MIX1
	q11.22	4684	RP11-314P12	11	0	95	11,6%	sehr gut	MIX1
	q22.3	0765	RP11- 136P13	5	0	47	10,6%	sehr gut	MIX1
	p11.23	4674	RP11-350D11	0	11	95	11,6%	sehr gut	MIX2
	cent	4678	RP11-43M19	1	14	95	15,8%	sehr gut	MIX2
	q21.1	4695	RP11-123L21	0	14	95	14,7%	gut	MIX2
	q24.2	4710	RP11-134P2	0	17	95	17,9%	gut	MIX2
11	p15.5	4726	RP11-596I23	0	13	95	13,7%	schwach	MIX1
	p13.4	3833	RP11-11A9	-	89	270	33,0%	sehr gut	MIX1
	q11	2926	RP11- 380O22	19	83	270	37,8%	sehr gut	MIX1
	q12.2	3854	RP11-339I12	-	182	270	67,4%	gut	MIX1
	q14.3	3861	RP11-546N8	-	36	270	13,3%	gut	MIX1
	q22.3	4761	RP11-805N8	11	1	95	12,6%	sehr gut	MIX1
	p15.5	3831	RP11-401C19	-	166	270	61,5%	sehr gut	MIX2
	p13	4733	RP11-297A4	14	0	95	14,7%	gut	MIX2
	p11.12	2924	RP11-208A14	0	27	270	10,0%	schwach	MIX2
	q12.2	4748	RP11-677J17	0	16	95	16,8%	gut	MIX2
	q14.3	4759	RP11-693N16	10	0	95	10,5%	schwach	MIX2
	q22.1	4760	RP11-240L24	1	32	95	34,7%	gut	MIX2
12	p13.33	4765	RP11-636B1	11	0	95	11,6%	sehr gut	MIX1
	p13.32	3875	RP11-407P10	-	37	270	13,7%	gut	MIX1
	p12.3	4771	RP11-692M23	0	11	95	11,6%	sehr gut	MIX1
	cent	4775	RP11-657P13	0	16	95	16,8%	schwach	MIX1
	q13.3	3891	RP11-181L23	-	37	270	13,7%	sehr gut	MIX1
	q21.1	4781	RP11-349G3	1	12	95	13,7%	sehr gut	MIX1
	q24.31	4792	RP11-107L10	0	14	95	14,7%	gut	MIX1
13	q14.11	4799	RP11-706I14	48	0	95	50,5%	schwach	MIX1
	q21.1	0169	RP11-100C24	3	16	55	34,5%	sehr gut	MIX1
	q21.31	4807	RP11-809O8	10	0	95	10,5%	sehr gut	MIX1
	q31.1	4807	RP11-164M23	10	0	95	10,5%	sehr gut	MIX1
	q14.3	4804	RP11-483O1	14	0	95	14,7%	gut	MIX2
	q21.32	4808	RP11-1L24	21	0	95	22,1%	gut	MIX2
	q21.33	4810	RP11-590I16	0	13	95	13,7%	sehr gut	MIX2
	q21.31	2173	RP11-151G10	0	2	269	0,7%	sehr gut	MIX3
	q31.1	-	RP11-417I19	-	-	-	-	gut	MIX3
	q31.1	0171	RP11-80N10	0	1	55	1,8%	sehr gut	MIX3

Fortsetzung Tab. 49

14	q11.1	2256	RP11-645B7	39	1	269	14,9%	sehr gut	MIX1
	q11.2	4829	RP11-642H22	18	0	95	18,9%	gut	MIX1
	q24.1	4838	RP11-350H11	0	24	95	25,3%	sehr gut	MIX1
	q32.11	4844	RP11-1A3	24	0	95	25,3%	sehr gut	MIX1
	q11.1	376	831B15	0	28	50	56,0%	sehr gut	MIX2
	q12	0175	RP11-125A5	6	2	55	14,5%	gut	MIX2
	q24.3	3942	RP3-414A15	-	52	270	19,3%	gut	MIX2
	q32	0773	RP11-141I7	0	32	47	68,1%	sehr gut	MIX2
	q11.2	4826	RP11-449I24	49	0	95	51,6%	gut	MIX3
	q32.33	0774	RP11-76N15	1	5	47	12,8%	sehr gut	MIX3
	q32.33	4858	RP11-379F22	0	27	95	28,4%	sehr gut	MIX3
15	q11.1	3070	RP11-2F9	-	24	270	84,4%	sehr gut	MIX1
	q11.2	4874	RP11-603B24	23	6	95	30,5%	sehr gut	MIX1
	q13.2	3955	RP11-261B23	-	66	270	24,4%	sehr gut	MIX1
	q13.2	4887	RP11-736I24	56	0	95	58,9%	sehr gut	MIX1
	q11.2	4881	RP11-110H15	12	0	95	12,6%	sehr gut	MIX2
	q12	0775	RP11-138C5	0	18	47	38,3%	sehr gut	MIX2
	q13.3	4892	RP11-282F10	2	10	95	12,6%	gut	MIX2
	q14	4897	RP11-475A13	24	0	95	25,3%	sehr gut	MIX2
16	p13.3	3987	RP11-64L12	-	64	270	23,7%	schwach	MIX1
	p13.3	4917	RP11-451K7	0	29	95	30,5%	schwach	MIX1
	p13.11-12.3	4928	RP11-32I24	0	21	95	22,1%	sehr gut	MIX1
	p12.3	4930	RP11-173H7	15	0	95	15,8%	sehr gut	MIX1
	p12.1	4935	RP11-705C1	13	0	95	13,7%	sehr gut	MIX2
	p11.2	4939	RP11-438O7	0	43	95	45,3%	schwach	MIX2
	p11.2-cent	4952	RP11-77M7	12	0	95	12,6%	sehr gut	MIX2
	q12.2	4956	RP11-285E14	22	0	95	23,2%	gut	MIX2
	q22.1	4961	RP11-803F16	0	17	95	17,9%	gut	MIX3
	q23.3	4969	RP11-727C20	2	21	95	24,2%	schwach	MIX3
	q24.3	4018	RP11-104N10	-	58	270	21,5%	sehr gut	MIX3
	q24.3	4978	RP11-354M24	38	1	95	41,1%	gut	MIX3
	q24.3	4976	RP11-370B20	0	10	95	10,5%	schwach	MIX3
17	p11.2	2219	RP11-158M20	33	0	269	12,3%	sehr gut	MIX1
	q12	0799	RP11-586K24	46	0	47	97,9%	sehr gut	MIX1
	q21.33	5017	RP11-121F10	0	12	95	12,6%	gut	MIX1
	q25.3	5036	RP11-149I9	0	13	95	13,7%	schwach	MIX1
	p11.2	4027	RP11-822E23	-	120	270	44,4%	schwach	MIX2
	q12	5014	RP11-84A7	0	40	95	42,1%	sehr gut	MIX2
	q21	0802	RP11-243L6	0	23	47	48,9%	gut	MIX2
	q23.2	4044	RP11-165E2	-	31	270	11,5%	sehr gut	MIX2
	p11.2	4025	RP11-160E2	-	96	270	35,6%	sehr gut	MIX3
	q12	4034	RP11-678G7	-	193	270	71,5%	sehr gut	MIX3
	q12	5003	RP11-121G16	5	24	95	30,5%	sehr gut	MIX3
	q25.3	5039	RP11-730A9	0	17	95	17,9%	schwach	MIX3

Fortsetzung Tab. 49

18	p11.21	5046	RP11- 559O1	12	0	95	12,6%	gut	MIX1
	q12.1	5050	RP11-317G20	15	0	95	15,8%	sehr gut	MIX1
	q21.1	5055	RP11-93N16	0	11	95	11,6%	sehr gut	MIX1
	q22	5061	RP11-704G7	33	0	95	34,7%	sehr gut	MIX1
	q22.2	5061	RP11-692N16	33	0	95	34,7%	gut	MIX1
19	p13.2	0220	RP11-79F15	2	13	55	27,3%	gut	MIX1
	q13.2	3192	RP11-1096L2	-	30	270	65,2%	sehr gut	MIX1
	q13.33	5111	RP11-21O13	0	25	95	26,3%	gut	MIX1
	p13.2	0808	RP11-367L15	12	0	47	25,5%	gut	MIX2
	p13.2	5087	RP11-751C24	0	11	95	11,6%	schwach	MIX2
	q13.42	4088	RP11-1151I21	-	35	270	13,0%	sehr gut	MIX2
20	p13	4090	RP11-77C3	-	78	270	28,9%	sehr gut	MIX1
	p12.3	5124	RP11-164M15	0	24	95	25,3%	sehr gut	MIX1
	q11.21	5131	RP11-559K10	1	10	95	11,6%	gut	MIX1
	q13.33	5150	RP11-95N13	0	13	95	13,7%	gut	MIX1
	p12.1	5127	RP11-9L7	22	0	95	23,2%	gut	MIX2
	q11.23	5136	RP11-727D18	10	0	95	10,5%	sehr gut	MIX2
	q13.12	4102	RP11-811I10	-	118	270	43,7%	gut	MIX2
	q13.32	4104	RP11-402F1	-	36	270	13,3%	sehr gut	MIX2
	p12.1	0224	RP11-80N12	0	1	55	1,8%	sehr gut	MIX3
	q11.21	4100	RP11-322B6	-	47	270	17,4%	schwach	MIX3
	q13.2	0286	RP4-749H19	1	0	55	1,8%	sehr gut	MIX3
	q13.33	5144	RP11-93B14	0	7	95	7,4%	sehr gut	MIX3
21	p11.2	5151	RP11-376P20	1	33	95	35,8%	gut	MIX1
	p11.2	5155	RP11-313K4	0	21	95	22,1%	sehr gut	MIX1
	q11.2	5158	RP11-641G16	0	11	95	11,6%	gut	MIX1
	q21.1	3229	RP11-662K22	0	62	270	23,0%	schwach	MIX1
	p11.2	5153	RP11-430M17	0	29	95	30,5%	gut	MIX2
	q21.1	5160	RP11-580L2	52	5	95	60,0%	schwach	MIX2
	q22.3		RP11-88N2	0	2	55	3,6%	sehr gut	MIX2
22	q13.1	5186	RP11-806D2	0	10	95	10,5%	schwach	MIX1
	q11.22	2267	RP11- 359L2	24	20	269	16,4%	sehr gut	MIX1
	q13.31-32	5191	RP11-689F11	3	15	95	18,9%	sehr gut	MIX1
	cent	5166	RP11-561P7	15	0	95	15,8%	gut	MIX2
	q11.21	5171	RP11-818K20	63	1	95	67,4%	sehr gut	MIX2
	q12.3	5182	RP11-467L10	67	0	95	70,5%	sehr gut	MIX2
	q13.1	5184	RP11-515J23	0	27	95	28,4%	gut	MIX2
	q11.21	0816	RP11- 379N11	1	14	47	31,9%	gut	MIX3
	q11.2	0815	RP11-775G6	0	15	47	31,9%	sehr gut	MIX3
	q13.32	4135	RP1-100G10	-	48	270	17,8%	sehr gut	MIX3
X	p22.31	4144	RP11-126O22	-	28	270	10,4%	gut	MIX1
	p21.31	0241	RP6-27C10	6	4	55	18,2%	sehr gut	MIX1
	p21.1	0242	RP4-769D20	10	4	55	25,5%	sehr gut	MIX1
	p11.1	4150	RP11-278E11	-	74	270	27,4%	sehr gut	MIX1
	q25	0252	RP6-64P14	6	4	55	18,2%	gut	MIX1
	q25	4172	RP11-17F16	-	37	270	13,7%	gut	MIX1
	q27.1	4175	RP11-965H15	-	46	270	17,0%	sehr gut	MIX1



Tab. 50: Zusammenstellung gesamtgenomischer Mix.

Chromosom	Bande	Variation	BAC	Zugewinn	Verlust	Anzahl Probanden	Häufigkeit [%]	Signalstärke
1	p36.33-32	4193	RP11-83K22	0	48	95	50,5%	sehr gut
1	p34.2	4219	RP11-350G5	3	37	95	42,1%	sehr gut
1	p34.1	4220	RP11-802K22	0	25	95	26,3%	sehr gut
1	p32.3	4223	RP11-469M21	0	28	95	29,5%	sehr gut
1	p32.2	0008	RP6-65F20	9	3	55	21,8%	gut
1	p21.1	3302	RP11-508C1	-	175	270	64,8%	sehr gut
1	p21.1	0012	RP11-259N12	10	7	55	30,9%	schwach
1	p13.3	3305	RP11-483I13	-	113	270	41,9%	schwach
1	q21.3	3314	RP1-110I3	0	138	270	51,1%	gut
1	q23.3	2329	RP11-5K23	28	23	270	18,9%	gut
1	q24.2	3319	RP11-97P20	0	116	270	43,0%	gut
1	q25.3	4265	RP11-120O21	4	40	95	46,3%	sehr gut
1	q31	0687	RP11-109P13	0	6	47	12,8%	gut
1	q42.2	4271	RP11-109G24	0	21	95	22,1%	sehr gut
2	p13.1	3366	RP11-1P9	-	29	270	10,7%	sehr gut
2	p12	0265	RP11-398N13	0	2	20	10,0%	gut
2	p11.2	4295	RP11-15J7	0	25	95	26,3%	sehr gut
2	p11.2	0373	RP11-421K23	0	44	50	88,0%	gut
2	q23.3	4311	RP11-58K7	24	0	95	25,3%	sehr gut
2	q24.3	4318	RP11-1N14	17	0	95	17,9%	sehr gut
2	q36.3	4329	RP11-474O20	17	0	95	17,9%	sehr gut
2	q37.1	3408	RP11-52C8	-	138	270	51,1%	sehr gut
3	p21.31	4333	RP11-219A11	7	9	95	16,8%	gut
3	p21.1	4339	RP11-813O11	11	0	95	11,6%	gut
3	q26.32	0040	RP11-114M1	1	8	55	16,4%	gut
3	q29	2064	RP11-1112O10	27	12	269	14,5%	sehr gut
4	p16.1	2067	RP11-261G12	0	30	269	11,2%	schwach
4	p15.31	4380	RP11-644J20	9	18	95	28,4%	gut
4	p13	4391	RP11-676K10	0	22	95	23,2%	sehr gut
4	q12-cen	4397	RP11-359C9	2	16	95	18,9%	sehr gut
4	q11	3494	RP11-365H22	-	65	270	24,1%	sehr gut
4	q31.21-22	-	RP11- 412J20	-	48	270	17,8%	gut
4	q35.1	4423	RP11-818I13	13	0	95	13,7%	sehr gut
5	p15.33	0707	RP11-812N8	16	2	47	38,3%	sehr gut
5	p15.1	4432	RP11-77P12	20	1	95	22,1%	sehr gut
5	p12	4441	RP11-813J10	15	0	95	15,8%	sehr gut
5	q15	3561	RP11-461G12	-	139	270	51,5%	gut
5	q23.1	4474	RP11-567A12	14	0	95	14,7%	sehr gut
5	q23.3	3576	RP11-1143N16	-	102	270	37,8%	gut
5	q35.3	3589	RP11-265K23	-	54	270	20,0%	gut



Fortsetzung Tab. 50

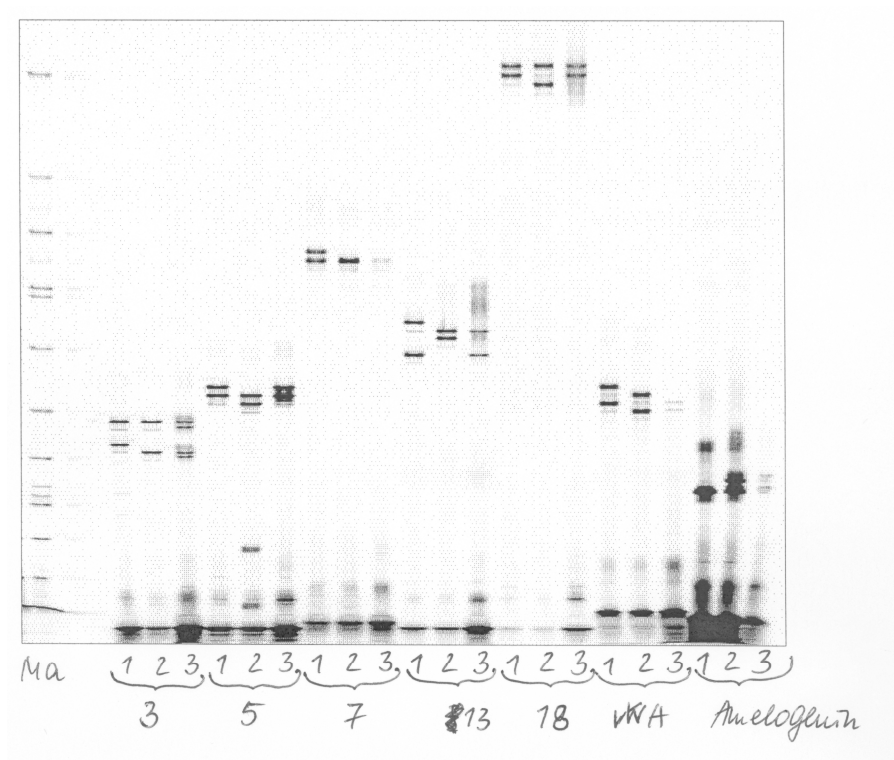
6	p22.1	4669	RP11-192H11	1	25	95	27,37%	gut
6	p21.33-32	4492	RP11-427G15	0	36	95	37,89%	sehr gut
6	q14.1	3623	RP11-897A20	-	112	270	41,48%	gut
6	q14.1	2644	RP11-483P24	0	65	270	24,07%	sehr gut
6	q15	3625	RP1-214H13	-	31	270	11,48%	sehr gut
6	q16.3	3631	RP11-1145D19	-	130	270	48,15%	gut
6	q21	4506	RP11-638G1	27	1	95	29,47%	sehr gut
6	q25.1	4512	RP11-655H19	20	0	95	21,05%	gut
6	q25.3	4513	RP11-360G17	26	0	95	27,37%	sehr gut
6	q27	3655	RP11-37D8	-	72	270	26,67%	sehr gut
7	p21.1	292	RP11-79G16	0	2	20	10,0%	gut
7	p15.1	4529	RP11-643O8	21	1	95	23,2%	sehr gut
7	q11.1	0375	RP11-138B1	0	11	50	22,0%	schwach
7	q11.23	4543	RP11-422O1	0	16	95	16,8%	gut
7	q22.1	3692	RP11-395B7*	-	85	269	31,6%	gut
7	q33	3704	RP11-639H21	-	43	270	15,9%	sehr gut
7	q34	0726	RP11-45N9	15	2	47	36,2%	gut
7	q34	3708	RP11-307I2	-	206	270	76,3%	sehr gut
7	q35	4572	RP11-634O11	0	67	95	70,5%	sehr gut
8	p23.3	4276	RP11-410N18	0	18	95	18,9%	schwach
8	p23	0736	RP11-774P7	6	15	47	44,7%	sehr gut
8	p21.2	4588	RP11-115K10	11	0	95	11,6%	sehr gut
8	p11.23	2749	RP11-122L4	0	92	270	34,1%	sehr gut
8	q11.21	4591	RP11-803P16	13	0	95	13,7%	sehr gut
8	q12.1	4594	RP11-430H18	16	6	95	23,2%	sehr gut
9	p21.2	4616	RP11-802E2	17	4	95	22,1%	gut
9	p12	2818	RP11-708D13	15	21	270	13,3%	gut
9	q22.32	4645	RP11-519D15	18	0	95	18,9%	sehr gut
9	q31.1	2826	RP11-386L12	3	70	270	27,0%	gut
9	q34.2	4659	RP11-205O8	1	10	95	11,6%	schwach
9	q34.3	3787	RP11-424E7	-	27	270	10,0%	sehr gut
10	p13	4666	RP11-40D12	10	2	95	12,6%	sehr gut
10	p12.31	2856	RP11-51E20	3	63	270	24,4%	sehr gut
10	p11.21	4676	RP11-810B23	11	0	95	11,6%	sehr gut
10	q11.22	4684	RP11-314P12	11	0	95	11,6%	sehr gut
10	q21.1	4695	RP11-123L21	0	14	95	14,7%	gut
10	q24.2	4710	RP11-134P2	0	17	95	17,9%	gut
11	q12.2	4748	RP11-677J17	0	16	95	16,8%	gut
11	q14.3	4759	RP11-693N16	10	0	95	10,5%	schwach
11	q22.1	4760	RP11-240L24	1	32	95	34,7%	gut
11	q22.3	4761	RP11-805N8	11	1	95	12,6%	sehr gut
12	p13.33	4765	RP11-636B1	11	0	95	11,6%	sehr gut
12	p13.32	3875	RP11-407P10	-	37	270	13,7%	gut
12	p13.31	4768	RP11-536M6	0	79	95	83,2%	schwach
12	p12.3	4771	RP11-692M23	0	11	95	11,6%	sehr gut
12	q24.31	4792	RP11-107L10	0	14	95	14,7%	gut
13	q14.11	4799	RP11-706I14	48	0	95	50,5%	schwach
13	q21.1	0169	RP11-100C24	3	16	55	34,5%	sehr gut
13	q21.32	4808	RP11-1L24	21	0	95	22,1%	gut

Fortsetzung Tab. 50

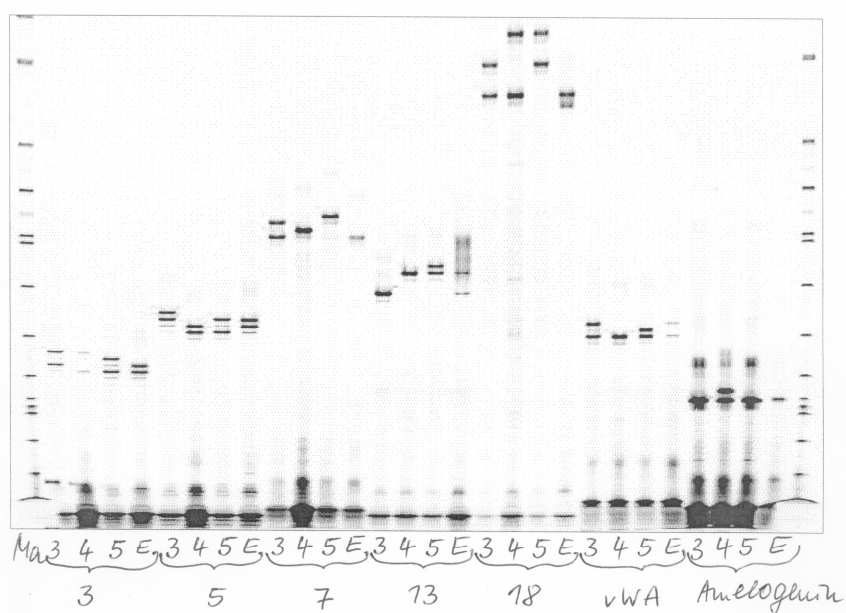
14	q11.1	0376	RP11-24N17	0	28	50	56,0%	sehr gut
14	q11.2	4831	RP11-262M15	39	0	95	41,1%	sehr schwach
14	q11.2	4829	RP11-642H22	18	0	95	18,9%	gut
14	q24.1	4838	RP11-350H11	0	24	95	25,3%	sehr gut
14	q32	0773	RP11-141I7	0	32	47	68,1%	sehr gut
14	q32.11	4844	RP11-1A3	24	0	95	25,3%	sehr gut
15	q12	0775	RP11-138C5	0	18	47	38,3%	sehr gut
15	q13.2	3955	RP11-261B23	-	66	270	24,4%	sehr gut
15	q13.2	4887	RP11-736I24	56	0	95	58,9%	sehr gut
15	q14	4897	RP11-475A13	24	0	95	25,3%	sehr gut
16	p13.11-12.3	4928	RP11-32I24	0	21	95	22,1%	sehr gut
16	p12.3	4930	RP11-173H7	15	0	95	15,8%	sehr gut
16	p11.2-cent	4952	RP11-77M7	12	0	95	12,6%	sehr gut
16	q22.1	4961	RP11-803F16	0	17	95	17,9%	gut
16	q24.3	4018	RP11-104N10	-	58	270	21,5%	sehr gut
17	p11.2	4025	RP11-160E2	-	96	270	35,6%	sehr gut
17	q12	4034	RP11-678G7	-	193	270	71,5%	sehr gut
17	q12	0799	RP11-586K24	46	0	47	97,9%	sehr gut
17	q12	5014	RP11-84A7	0	40	95	42,1%	sehr gut
17	q21	0802	RP11-243L6	0	23	47	48,9%	gut
18	p11.32	5044	RP11-806L2	14	1	95	15,8%	schwach
18	q12.1	5050	RP11-317G20	15	0	95	15,8%	sehr gut
18	q21.1	5055	RP11-93N16	0	11	95	11,6%	sehr gut
18	q22	5061	RP11-704G7	33	0	95	34,7%	sehr gut
18	q22.2	5061	RP11-692N16	33	0	95	34,7%	gut
19	p13.2	0220	RP11-79F15	2	13	55	27,3%	gut
19	p13.2	2239	RP11-367L15	58	2	95	63,2%	gut
19	q13.2	3192	RP11-1096L2	146	30	270	65,2%	sehr gut
19	q13.33	5111	RP11-21O13	0	25	95	26,3%	gut
20	p12.1	5127	RP11-9L7	22	0	95	23,2%	gut
20	q11.23	5136	RP11-727D18	10	0	95	10,5%	sehr gut
21	q11.2	5158	RP11-641G16	0	11	95	11,6%	gut
22	q11.21	0816	RP11- 379N11	1	14	47	31,9%	gut
22	q12.3	5182	RP11-467L10	67	0	95	70,5%	sehr gut
22	q13.1	5184	RP11-515J23	0	27	95	28,4%	gut
X	p22.33	2274	RP11-1001E7	6	32	269	14,1%	schwach
X	p22.31	4144	RP11-126O22	-	28	270	10,4%	gut
X	p21.31	0241	RP6-27C10	6	4	55	18,2%	sehr gut
X	p11.1	4150	RP11-278E11	-	74	270	27,4%	sehr gut
X	q25	4172	RP11-17F16	-	37	270	13,7%	gut
X	q27.2	4176	RP11-793M9	-	38	270	14,1%	schwach

Tab. 51: Primer für die Mikrosatelliten-PCR.

Primer	Lokalisation
D3S1358	3p21
D5S818	5q23
D7S820	7q21
D8S1179	8q24 + 2
D13S317	13q22
D18S51	18q21
D21S11 (-)	21q21
vWA	12p13
FGA	4q28
Amelogenin	Xp22 + 2
-	Yp11 + 2
D21S11	21q21



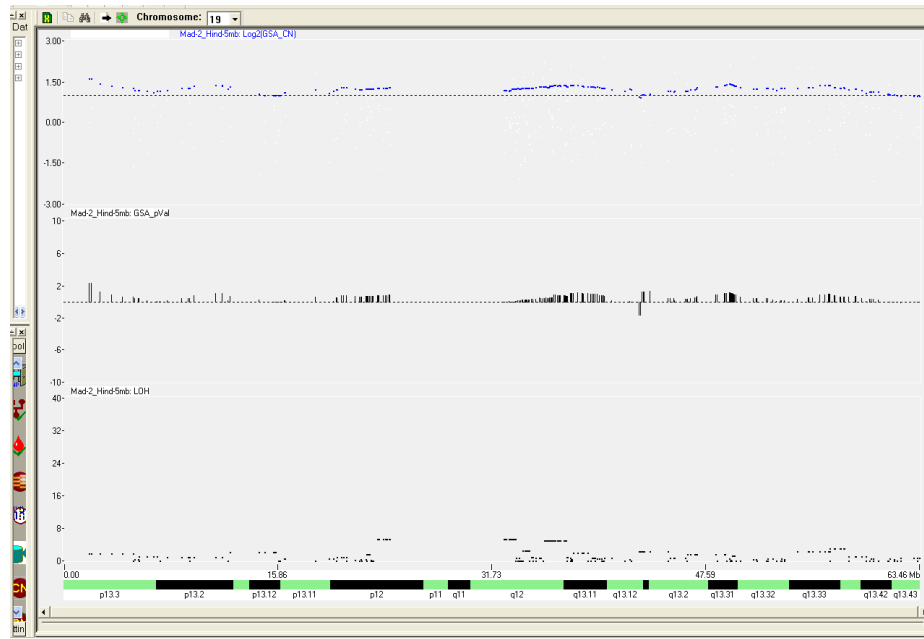
**Abb. 30: Ergebnis der Gelelektrophorese nach Mikrosatelliten-PCR für die Personen I/3 (1), I/4 (2) und II/2 (39).** Links ist der Längenstandard sichtbar, nach rechts folgen die jeweiligen Primer (siehe Tab. 50).



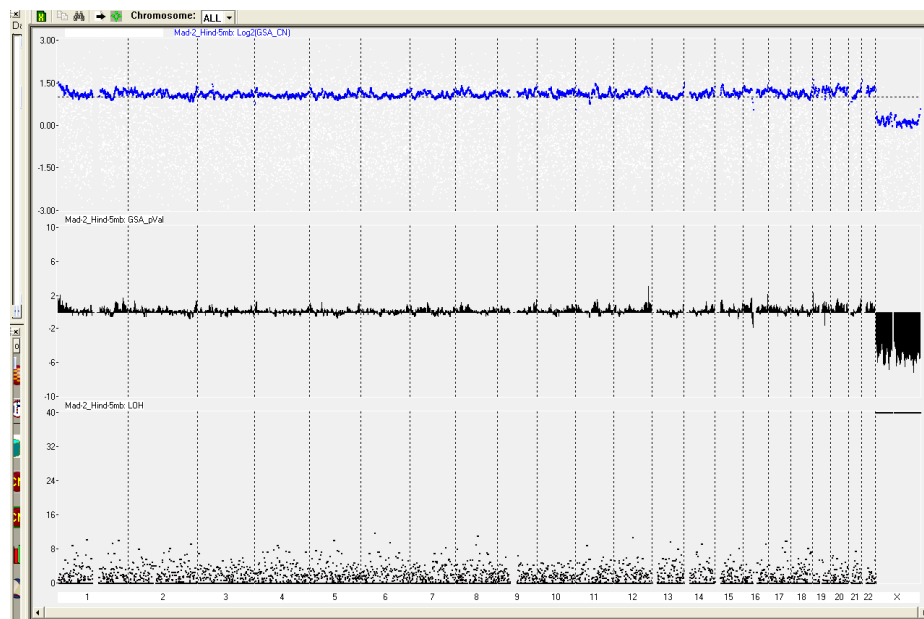
**Abb. 31: Ergebnis der Gelelektrophorese nach Mikrosatelliten-PCR für die Personen I/3 (3), I/2 (4) und II/1 E.** Die Darstellung ist die gleiche wie in Abb. 30. Person 5 ist die Mutter von I/2.

Tab. 52: Zusammenstellung gesamtgenomischer Mix Knochenmark.

	Chromosom	Bande	Variation	BAC	Zugewinn	Verlust	Anzahl Probanden	Häufigkeit [%]	Signalstärke
1	p36.33-32	4193	RP11-83K22	0	48	95	50,5%	sehr gut	
1	p34.2	4219	RP11-350G5	3	37	95	42,1%	sehr gut	
1	p21.1	0012	RP11-259N12	10	7	55	30,9%	schwach	
1	p21.1	3302	RP11-508C1	-	175	270	64,8%	sehr gut	
1	p13.3	3305	RP11-483I13	-	113	270	41,9%	schwach	
1	q21.3	3314	RP1-110I3	0	138	270	51,1%	gut	
1	q24.2	3319	RP11-97P20	0	116	270	43,0%	gut	
1	q25.3	4265	RP11-120O21	4	40	95	46,3%	sehr gut	
2	p11.2	0373	RP11-685N3	0	44	50	88,0%	gut	
2	q37.1	3408	RP11-52C8	-	138	270	51,1%	sehr gut	
5	p15.33	0707	RP11-812N8	16	2	47	38,3%	sehr gut	
5	q23.3	3576	RP11-1143N16	-	102	270	37,8%	gut	
6	p21.33-32	4492	RP11-427G15	0	36	95	37,89%	sehr gut	
6	q14.1	3623	RP11-897A20	-	112	270	41,48%	gut	
6	q16.3	3631	RP11-1145D19	-	130	270	48,15%	gut	
7	q22.1	3692	RP11-395B7	-	85	269	31,6%	gut	
7	q34	3708	RP11-307I2	-	206	270	76,3%	sehr gut	
7	q34	0726	RP11-45N9	15	2	47	36,2%	gut	
7	q35	4572	RP11-634O11	0	67	95	70,5%	sehr gut	
8	p23	0736	RP11-774P7	6	15	47	44,7%	sehr gut	
8	p11.23	2749	RP11-122L4	0	92	270	34,1%	sehr gut	
11	q22.1	4760	RP11-240L24	1	32	95	34,7%	gut	
12	p13.31	4768	RP11-536M6	0	79	95	83,2%	schwach	
13	q14.11	4799	RP11-706I14	48	0	95	50,5%	schwach	
13	q21.1	0169	RP11-100C24	3	16	55	34,5%	sehr gut	
14	q11.1	0376	RP11-831B15	0	28	50	56,0%	sehr gut	
14	q11.2	4831	RP11-262M15	39	0	95	41,1%		
14	q32	0773	RP11-141I7	0	32	47	68,1%	sehr gut	
15	q12	0775	RP11-138C5	0	18	47	38,3%	sehr gut	
15	q13.2	4887	RP11-736I24	56	0	95	58,9%	sehr gut	
16	p11.2	4939	RP11-438O7	0	43	95	45,3%	schwach	
17	p11.2	4025	RP11-160E2	-	96	270	35,6%	sehr gut	
17	q12	4034	RP11-678G7	-	193	270	71,5%	sehr gut	
17	q12	0799	RP11-586K24	46	0	47	97,9%	sehr gut	
17	q12	5014	RP11-84A7	0	40	95	42,1%	sehr gut	
17	q21	0802	RP11-243L6	0	23	47	48,9%	gut	
18	q22.2	5061	RP11-692N16	33	0	95	34,7%	gut	
19	p13.2	5080	RP11-367L15	58	2	95	63,2%	-	
19	q13.2	3192	RP11-1096L2	146	30	270	65,2%	sehr gut	
20	q13.12	4102	RP11-811I10	-	118	270	43,7%	gut	
22	q11.21	0816	RP11- 379N11	1	14	47	31,9%	gut	
22	q12.3	5182	RP11-467L10	67	0	95	70,5%	sehr gut	



**Abb. 32: SNP-Array Ergebnis des Falls mit Polymorphismus im Chromosom 19 nach pod-FISH.** Das Chromosom 19 zeigte nach SNP-Array Auswertung keine Auffälligkeiten.



**Abb. 33: SNP-Array Ergebnis des Falls mit Polymorphismen in mehreren Chromosomen nach pod-FISH.** Mit SNP-Array konnten keine Auffälligkeiten nachgewiesen werden.

Tab. 53: Zusammenstellung der Mixe für Chromosom 7.

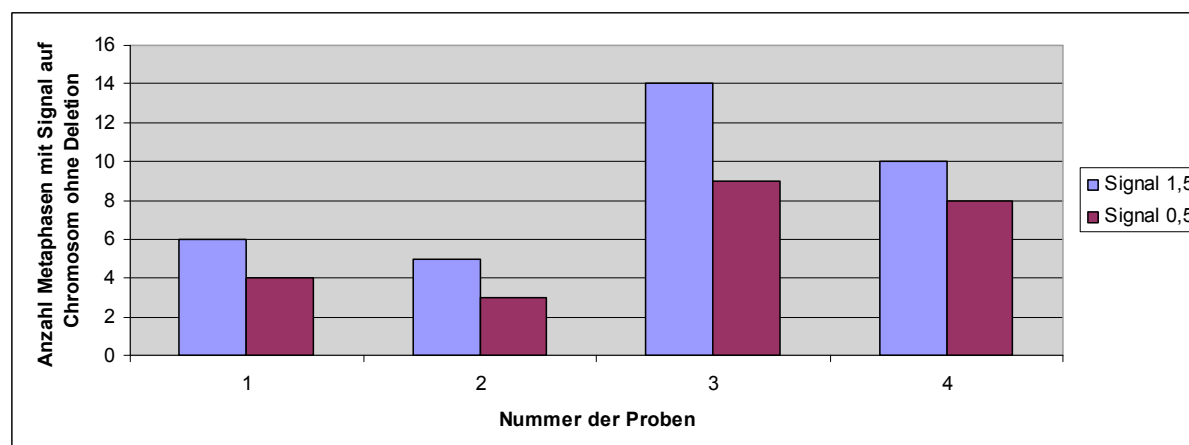
Chromosom	Bande	Variation	BAC	Häufigkeit	Signalstärke	Kreuzhybridisierung	SD	MIX
7	p15.1	4529	RP11-643O8	23,2%	sehr gut	-	+	MIX1
7	q22.1	3692	RP11-395B7	31,6%	gut	-	-	MIX1
7	q34	3707	RP11-1141E10	10,4%	sehr gut	9cen	+	MIX1
7	q34	3708	RP11-307I2	76,3%	sehr gut	-	+	MIX1
7	p15.3	4527	RP11-810J17	21,1%	sehr gut	10p13, 15qter	-	MIX2
7	q11.1	0375	RP11-144H20	22,0%	schwach	-	-	MIX2
7	q32.2	4560	RP11-537A1	22,1%	sehr gut	-	+	MIX2
7	q34	3707	RP11-1141E10	10,4%	sehr gut	9cen	+	MIX2
7	q35	4572	RP11-634O11	70,5%	sehr gut	-	+	MIX2
7	p21.1	292	RP11-79G16	10,0%	gut	-	-	Mix3
7	cen	4538	RP11-533E18	25,30%	sehr gut	-	-	Mix3
7	q22	0724	RP11-188C21	23,4%	schwach	-	-	Mix3
7	q31.33	4557	RP11-807H17	11,60%	gut	-	+	Mix3
7	q34	3707	RP11-1141E10	10,4%	sehr gut	9cen	+	Mix3
7	q11.23	4543	RP11-422O1	16,8%	gut	-	-	Mix4
7	q22.1	4550	RP11-344K24	11,60%	sehr gut	-	+	Mix4
7	q33	3704	RP11-639H21	15,9%	sehr gut	-	-	Mix4
7	q34	3707	RP11-1141E10	10,4%	sehr gut	9cen	+	Mix4
7	q34	0726	RP11-45N9	36,2%	gut	-	+	Mix4

Tab. 54: Ergebnisse der Hybridisierung der BACs vom Chromosom 7 auf die Suspensionen (S) 1-3. Die informativen BACs sind rot markiert.

Bande	BAC	S1		S2		S3	
		1/1	1,5/0,5	1/1	1,5/0,5	1/1	1,5/0,5
p15.1	RP11-643O8	21	1	22	2	14	8
q22.1	RP11-395B7	20	2	24	0	18	4
q34	RP11-1141E10	4	17*	10	14*	8	14*
q34	RP11-307I2	22	0	23	1	17	5
p15.3	RP11-810J17	23	1	22	1	19	3
q11.1	RP11-144H20	21	3	22	1	19	3
q32.2	RP11-537A1	23	1	23	0	19	3
q34	RP11-1141E10	8	13*	8	15*	12	10*
q35	RP11-634O11	19	5	23	0	20	2
p21.1	RP11-79G16	15	2	6	3	9	0
cen	RP11-533E18	14	2	8	1	9	0
q22	RP11-188C21	1	16	7	1	8	1
q31.33	RP11-807H17	16	0	-	-	9	0
q34	RP11-1141E10	7	10*	3	7*	4	6*
q11.23	RP11-422O1	-	-	14	2	4	0
q22.1	RP11-344K24	-	-	6	11	5	2
q33	RP11-639H21	-	-	17	0	7	0
q34	RP11-1141E10	-	-	4	13	2	5*
q34	RP11-45N9	-	-	14	3	6	1

**Tab. 55: Ergebnisse der Hybridisierung der BACs vom Chromosom 7 auf die Suspensionen (S) 4-6. Die informativen BACs sind rot markiert.**

Chromosom	Bande	BAC	S4		S5		S6	
			1/1	1,5/0,5	1/1	1,5/0,5	1/1	1,5/0,5
7	p15.1	RP11-643O8	4	4	6	1	19	2
7	q22.1	RP11-395B7	5	3	6	1	17	4
7	q34	RP11-1141E10	3	5*	1	6*	6	16*
7	q34	RP11-307I2	8	0	5	2	19	2
7	p15.3	RP11-810J17	-	-	8	2	23	0
7	q11.1	RP11-144H20	-	-	8	2	22	1
7	q32.2	RP11-537A1	-	-	8	2	20	3
7	q34	RP11-1141E10	-	-	5	4*	13	10*
7	q35	RP11-634O11	-	-	2	8	10	13
7	p21.1	RP11-79G16	23	5	7	2	6	1
7	cen	RP11-533E18	25	3	8	1	5	0
7	q22	RP11-188C21	1	26	4	5	3	4
7	q31.33	RP11-807H17	25	2	8	1	7	0
7	q34	RP11-1141E10	5	23*	2	7*	2	5*
7	q11.23	RP11-422O1	-	-	-	-	8	0
7	q22.1	RP11-344K24	-	-	-	-	4	6
7	q33	RP11-639H21	-	-	-	-	10	0
7	q34	RP11-1141E10	-	-	-	-	2	8*
7	q34	RP11-45N9	-	-	-	-	6	4



**Abb. 34: Graphische Darstellung der Verteilung der Signalstärken auf dem Chromosom 7 ohne Deletion.**



**Tab. 56: Verwendete Primer für die Mikrosatellitenanalyse der AML-Fälle mit Trisomie 8.**

<b>Nr.</b>	<b>Primer</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Größe [bp]</b>	<b>Nr. in Abb. 17</b>
8.1	D8S1099	8p23	253	-
8.2	D8S1145	8p21	271	-
8.3	D8S1110	8q11	262-286	7
8.4	D8S1113	8q12	215-245	8
8.5	D8S1119	8q21	173-197	9
8.6	D8S1132	8q23	150	10
8.7	D8S1128	8q24	240-268	11
8.8	D8S0373	8q24	197-213	12
8.a	D8S264	8p23	121-145	1
8.b	D8S1130	8p22	132-156	2
8.c	D8S1106	8p22	135-160	3
8.d	D8S1145	8p22	259-299	4
8.e	D8S136	8p21	70-90	5
8.f	D8S1477	8p12	139-179	6

## **V Lebenslauf**

### **Zur Person**

Madeleine Groß  
Schillerstr. 6  
79423 Heitersheim

Geburtsdatum: 09.05.1980  
Familienstand: ledig

### **Ausbildung**

- |               |   |
|---------------|---|
| 1993 – 1998   | <b>Diesterweg - Gymnasium Plauen,<br/>Abitur (Note 1,9)</b>   |
| 10/98 – 08/04 | <b>Friedrich - Schiller Universität Jena<br/>Studium der Biologie</b><br>Hauptfach Mikrobiologie, Nebenfächer Genetik, Anthro-<br>pologie und Wirtschaftswissenschaften<br>Abschluss: Diplom-Biologin (Note 1,5)  |
| 09/03 – 08/04 | <b>Diplomarbeit</b><br>„Identifizierung und Charakterisierung putativ evolutionär<br>relevanter Genombereiche in der Gattung <i>Pan</i> “<br>Institut für Humangenetik & Anthropologie der FSU Jena<br>(Note 1,3) |

### **Beruflicher Hintergrund**

- |               |   |
|---------------|---|
| 09/04 – 12/07 | <b>Friedrich – Schiller Universität Jena<br/>Institut für Humangenetik &amp; Anthropologie</b><br>Dissertation „Identifizierung und Charakterisierung<br>kryptischer Aberrationen bei akuten myeloischen<br>Leukämien mit normalem Karyotyp“<br>Förderung durch IZKF Jena |
|---------------|---|

Jena, den 25.06.08

## VI Publikationen

### Publikationen

1. Glaser M, Karst C, **Gross M**, Mkrtchyan H, Liehr T  
Chromosome torsions in cytogenetic preparations of bone-marrow – artifacts or leukemia-specific? Balk J Med Gen 2005, Vol 8, 27-31
2. **Gross M**, Starke M, Trifonov V, Claussen U, Liehr T, Weise A  
A molecular cytogenetic study of chromosome evolution in chimpanzee.  
Cytogenet Genome Res 2006, Vol 112, 67-75
3. Liehr T, **Gross M**, Karst C, Glaser M, Mrasek K, Starke H, Weise A, Mkrtchyan H, Kuechler A  
FISH banding in tumor cytogenetics.  
Cancer Genet Cytogenet. 2006 Jan 1;164(1):88-89
4. Karst C, **Gross M**, Haase D, Wedding U, Höffken K, Liehr T, Mkrtchyan H  
Novel cryptic chromosomal rearrangements detected in acute lymphoblastic leukemia (ALL) detected by application of new multicolor fluorescent in situ hybridization approaches.  
Int J Oncol. 2006 Apr; 28(4):891-897
5. Mkrtchyan H, Glaser M, **Gross M**, Wedding U, Höffken K, Liehr T, Karst C, Aroutiounian R  
Multicolor-FISH applied to resolve complex chromosomal changes in case of T-ALL (FAB L2).  
Cytogenet Genome Res 2006 Aug, 114(3-4):270-273
6. Liehr T, Starke H, Heller A, Kosyakova N, Mrasek K, **Gross M**, Karst C, Glaser M, Fickelscher I, Kuechler A, Trifonov V, Romanenko SA, Weise A  
Multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH) applied for FISH-banding.  
Cytogenet Genome Res. 2006 Aug, 114(3-4):240-244
7. Balci S, Unal A, Engiz O, Aktas D, Liehr T, **Gross M**, Mrasek K, Saygi S  
Bilateral periventricular nodular heterotopia, severe learning disability and epilepsy in a male with  
46,XY,der(19)t(X;19)(q11.1-11.2;p13.3).  
Developmental Medicine & Child Neurology 2007, 49: 219-224
8. Weise A, **Gross M**, Schmidt S, Claussen U, Liehr T  
Multicolor-FISH applied for Zoo-FISH studies: New aspects of chromosomal evolution in gorilla and orang-utan.  
Int J Mol Med 2007 Mar; 19:437-444

9. Weise A, **Gross M**, Mrasek K, Mkrtchyan H, Horsthemke B, Jonsrud C, von Eggeling F, Hinreiner S, Witthuhn V, Claussen U, Liehr T  
Parental-origin-determination FISH (pod-FISH) distinguishes homologues human chromosomes on a single cell level.  
Int J Mol Med. 2008 Feb, 21(2):189-200
10. Macedo Silva ML, Raimondi SC, Abdelhay E, **Gross M**, Mkrtchyan H, de Figueiredo AF, Ribeiro RC, de Jesus Marques-Salles T, Sobral ES, Gerardin Land MP, Liehr T.  
Banding and molecular cytogenetic studies detected a CBFB-MYH11 fusion gene that appeared as abnormal chromosomes 1 and 16 in a baby with acute myeloid leukemia FAB M4-Eo.  
Cancer Genet Cytogenet. 2008 Apr 1;182(1):56-60
11. Trifonov V, Fluri S, Binkert F, Nandini A, Anderson J, Rodriguez L, **Gross M**, Kosyakova N, Mkrtchyan H, Ewers E, Reich D, Weise A, Liehr T  
Complex rearranged small supernumerary marker chromosomes (sSMC), three new cases; evidence for an underestimated entity?  
Mol Cytogenet. 2008 Apr 15;1(1):6
12. **Gross M**, Mkrtchyan H, Glaser M, Weise A, Liehr T  
Delineation of new cryptic aberrations in acute myeloid leukemia with normal karyotype after banding cytogenetics.  
In prep.

#### Kongressbeiträge

1. **Gross M**, Liehr T, Claussen U, Trifonov V, Weise A  
High resolution molecular cytogenetic studies of chimpanzee chromosomes.  
MedGen 2005; Vol 17, S. 58
2. Glaser M, Roth A, Karst C, **Gross M**, Claussen U, Liehr T  
Chromosome-torsions detected in cytogenetic preparations of bone-marrow – preparation induced artifacts or something leukemia-specific?  
MedGen 2005; Vol 17, S. 112-118
3. **Gross M**, Mkrtchyan H, Glaser M, Karst C, Claussen U, Wedding U, Höffken K, Liehr T  
Cryptic rearrangements are detectable in ~40% of AML-cases with normal routine banding karyotype – a molecular cytogenetic pilot study on 40 cases.  
MedGen 2006; Vol 18, S. 46
4. Weise A, **Gross M**, Horsthemke B, Claussen U, Liehr T  
Parental origin determination FISH (pod FISH) can distinguish homologues chromosomes.  
MedGen 2006; Vol 18, S. 35

5. Liehr T, Mkrtchyan H, Karst C, **Gross M**, Hunstig F, Polityko A, Weise A  
Multicolor-FISH approaches applied in tumor cytogenetics.  
Abstractband IV Annual conference of south district of Russian Federation:  
Current advances in human genetics: clinical aspects, 27-29. April 2006,  
Russia, Kislovodsk
6. **Gross M**, Horsthemke B, Karst C, Mkrtchyan H, Claussen U, Liehr T, Weise A  
Parental-origin-determination FISH (pod-FISH): a new approach to distinguish  
homologues chromosomes.  
European Human Genetics Conference 2006, Amsterdam, Niederlande, 6.-9.  
Mai 2006
7. Silva MLM, **Gross M**, Raimondi S, Guasti GP, da Costa ES, de Sousa A,  
Pimenta G, Ribeiro RC, Abdelhay E, Liehr T  
Cytogenetic and multicolor banding studies revealed chromosome 1  
abnormalities in four infants with down syndrome myelodysplastic disorder that  
evolved to acute myeloid leukemia.
8. **Gross M**, Mkrtchyan H, Thieme H, von Eggeling F, Horsthemke B, Jonsrud C,  
Claussen U, Liehr T, Weise A  
Single Cell Epigenetics by parental origin determination (POD) FISH.  
EHA Scientific Workshop: The Role of Epigenetics in Hematological  
Malignancies; Mandelieu, Frankreich, 9.-11. Februar 2007
9. Mkrtchyan H, **Gross M**, Thieme H, von Eggeling F, Claussen U, Liehr T, Weise  
A  
How informative are microsatellite analysis? Towards analysing of epigenetic  
changes by differentiation of homologues chromosomes.  
EHA Scientific Workshop: The Role of Epigenetics in Hematological  
Malignancies; Mandelieu, Frankreich, 9.-11. Februar 2007
10. **Gross M**, Trifonov V, Liehr T, Weise A  
Of human and apes: A molecular cytogenetic study of chromosome evolution in  
chimpanzee.  
Genomic Disorders 2007, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK, 21.-24.  
März 2007
11. Mkrtchyan H, **Gross M**, Liehr T, Weise A  
Characterization of the parental origin of human chromosomes on a single cell  
level.  
Genomic Disorders 2007, Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK, 21.-24.  
März 2007

12. Weise A, **Gross M**, Mkrtchyan H, Thieme H, von Eggeling F, Horsthemke B, Jonsrud C, Claussen U, Liehr T  
Advances in parental origin determination (pod) FISH – evaluation and applications.  
MedGen 2007; Vol. 19, S. 79
13. Mkrtchyan H, Ghazaryan S, Avetisyan G, Muradyan L, Daghbashyan S, Karst C, **Gross M**, Aroutiounian R, Liehr T  
A new complex translocation event described in a case with chronic myelogenous leukemia involving BCR/ABL: t(6;9;22)(q11;q34;q11).  
MedGen 2007; Vol. 19, S. 107
14. Liehr T, Mkrtchyan H, Witthuhn V, Hinreiner S, **Gross M**, Mrasek K, Behr K, Schoder C, Weise A Molecular cytogenetics in tumor cells. A review  
Proceedings of the 27th Annual Convention of Indian Association for Cancer Research and International Symposium on Functional Genomics. Ahmedabad, India.  
7.-9. Februar 2008
15. Reich D, Rubtsov N, **Gross M**, Ogilvie CM, Trifonov V, Kosyakova N, Weise A, Liehr T  
Another case of a small supernumerary marker chromosome only stainable by DNA derived from itself.  
MedGen 2008; Vol. 20, S. 101
16. Liehr T, Trifonov V, Fluri S, Binkert F, Nandini A, Anderson J, Rodriguez L, **Gross M**, Kosyakova N, Mkrtchyan H, Ewers E, Reich D, Weise A  
Three new cases of complex rearranged small supernumerary marker chromosomes. Evidence for an underestimated entity?  
MedGen 2008; Vol. 20, S. 83
17. Mkrtchyan H., Macedo Silvia MLM, Raimondi SC, Abdelhay E, **Gross M**, de Figueiredo AF, Ribeiro AC, Marques- Salles TJ, Sobral ES, Land MPG, Liehr T  
Banding and monoclonar cytogenetic studies detected a *CBFβ-MYH11* fusion gene in a baby with acute myeloid leukemia FAB M4-Eo.  
MedGen 2008; Vol. 20, S. 108

## VII Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik und Anthropologie der Friedrich-Schiller Universität Jena angefertigt. An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke dem Institutsdirektor, Herrn Prof. Dr. U. Claussen, für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Dr. rer. nat. / med. habil. Thomas Liehr für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Bei Frau Dr. Anja Weise bedanke ich mich für die Betreuung und stetige Diskussionsbereitschaft sowie die Durchsicht des Manuskripts.

Ich danke den ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Zytogenetik für deren Unterstützung und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, ein besonderer Dank gilt Frau Monika Ziegler für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und geduldige Beantwortung meiner Fragen sowie meinen beiden Diplomanden Frau Sophie Hinreiner und Frau Vera Witthuhn, die ihre Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt haben.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meiner lieben Kollegin Frau Dr. Hasmik Mkrtchyan, die immer mit Rat und Tat an meiner Seite stand und für mich eine liebe Freundin geworden ist.

Ich danke Frau Nicole Posorski für die Durchführung der SNP-Analysen sowie Frau Julia Rosenhahn für die Hilfe bei der RealTime PCR.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Horsthemke aus Essen sowie F. Jonsrud aus Tromsø, Norwegen für die Bereitstellung von Lymphozytensuspensionen klinischer Fälle.

Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem IZKF in Jena.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Freunden für ihre aufmunternden Worte und die Durchsicht des Manuskripts bedanken.

Meiner Familie danke ich für die moralische und finanzielle Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Nico Spribille, der mit einer nicht endenden Geduld an meiner Seite stand und immer ein kritisches als auch aufmunterndes Wort bereit hatte.

## **VIII Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Jena, den 25.06.08

Madeleine Groß